

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Química Analítica**



**NUEVAS HERRAMIENTAS ANALÍTICAS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN EL  
MEDIO AMBIENTE Y EN ALIMENTOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Sonia Herranz de Andrés**

**Bajo la dirección de la doctora**

**María Cruz Moreno Bondi**

**Madrid, 2013**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



# NUEVAS HERRAMIENTAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN EL MEDIO AMBIENTE Y EN ALIMENTOS

Directora:  
**Dra. María Cruz Moreno Bondi**  
Catedrática de Universidad

TESIS DOCTORAL QUE PRESENTA  
**SONIA HERRANZ DE ANDRÉS**

Madrid, 2013





Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. Química Analítica

Ciudad Universitaria  
28040 Madrid  
Tfno.: 91.394.43.31  
Fax.: 91.394.43.29  
E-mail: depquian@quim.ucm.es

MARÍA CRUZ MORENO BONDI, CATEDRÁTICA DE  
UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA  
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

HACE CONSTAR:

Qué el trabajo titulado “Nuevas herramientas analíticas para la determinación de contaminantes en el medio ambiente y en alimentos” ha sido realizado bajo su dirección en el Grupo de Sensores Químicos Ópticos y Fotoquímica Aplicada (GSOLFA) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 14 de junio de 2013

Fdo. María Cruz Moreno Bondi

Fdo. Sonia Herranz de Andrés





## Agradecimientos

Me gustaría expresar mi gratitud a la Prof. María Cruz Moreno Bondi ya que sin su experiencia y dirección este trabajo no habría llegado a su fin.

Quisiera agradecer al Prof. Orellana, director del grupo GSOLFA, el haberme permitido formar parte del grupo durante estos años. Asimismo, quisiera agradecer a la Prof. Palacios, directora del Dto. Química Analítica donde se ha llevado a cabo esta tesis, el haberme recibido en el departamento.

Quiero dar las gracias a la Prof. Hall (*University of Cambridge, UK*), al Prof. Guisán (ICP-CSIC, Madrid), al Prof. Homola (*Institute of Photonics and Electronics, Prague*), al Prof. Belkin (*The Hebrew University of Jerusalem, Israel*) y a la Prof. Marco (IQAC-CSIC, Barcelona) por acogerme en sus grupos de investigación durante distintos periodos de tiempo a lo largo de estos años de formación.

Por otro lado, me gustaría agradecer a la Prof. Marazuela (UCM), a la Prof. Domingo (IEM-CSIC, Madrid), al Prof. Gheber (*Ben-Gurion University of the Negev, Israel*), a la Prof. Vélez (ICP-CSIC, Madrid), al Prof. Fierro (ICP-CSIC, Madrid), a la Dra. Benito-Peña (UCM), al Dr. Olea (ICP-CSIC, Madrid), a la Dra. Marciello (ICP-CSIC, Madrid), al Dr. Ramón-Azcón (WPI-AIMR), a la Lda. Bocková (IPE, Praga) y a la Lda. Hernández (IEM-CSIC, Madrid), su colaboración en distintas partes de este trabajo.

Esta investigación ha sido posible gracias a la financiación aportada por el MEC (CTQ2006-15610-C02 y CTQ2009-14565-C03), la UCM (GR35/10-A) y la CAM (S-0505/AMB/0374), y gracias al MEC por la concesión de una beca FPI, a la CAM por la concesión de un contrato CPI y al Ministerio de Educación por la concesión de una Beca de Movilidad para la obtención de la Mención de Doctor Europeo.

Por último, me gustaría agradecer el continuo apoyo de todos mis compañeros de departamento y miembros del grupo GSOLFA, en especial a Elena, Erika, Klecia, Sergio, Alberto y Victoria. Vosotros habéis conseguido transformar mi frustración en risa, habéis celebrado mis logros y compartido conmigo los vuestros. Lo mejor de esta experiencia ha sido, sin duda, el haberos conocido.

Sonia.



*We shall not cease from exploration  
and the end of all our exploring  
will be to arrive where we started  
and know the place for the first time.*

*T.S. Eliot*



*A mis padres,  
que vigilan la marea mientras juego en el mar.*

*A mis hermanos,  
que me quieren sin piedad.*



## ÍNDICE

---





1. Summary.....	7
2. Introducción .....	17
2.1. Contaminantes en alimentos y en el medio ambiente .....	19
2.1.1. Origen y clasificación .....	19
2.1.2. Riesgos asociados a la presencia de contaminantes.....	20
2.1.2.1. Medicamentos de uso veterinario.....	21
2.1.2.2. Plaguicidas .....	22
2.1.2.3. Toxinas naturales .....	23
2.1.3. Empleo de antibióticos fluoroquinolonas en medicina humana y veterinaria .....	24
2.1.4. Empleo de herbicidas triazínicos en agroalimentación.....	28
2.1.5. Toxinas naturales: microcistinas .....	34
2.1.6. Legislación y control de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos.....	40
2.1.7. Legislación y control de microcistinas, pesticidas y residuos de medicamentos veterinarios en aguas medioambientales.....	44
2.2. Biosensores .....	49
2.2.1. Consideraciones generales de los biosensores. Definición y clasificación.....	50
2.2.2. Biosensores ópticos.....	54
2.2.3. Biosensores ópticos de onda evanescente basados en el empleo de una guía de onda plana .....	56
2.2.3.1. Biosensores ópticos basados en SPR .....	57
2.2.3.2. Biosensores ópticos basados en fluorescencia. Matrices de biosensores .....	61
2.2.4. Inmunosensores.....	64
2.2.4.1. Clasificación de los inmunosensores.....	68
2.2.4.2. Características analíticas.....	70
2.2.4.3. Empleo de quimeras para el desarrollo de inmunosensores .....	72
2.3. Métodos analíticos para la determinación de triazinas, fluoroquinolonas y microcistinas.....	77
2.3.1. Tratamiento de la muestra: métodos de extracción, limpieza y preconcentración.....	77

2.3.1.1.	Aguas.....	78
2.3.1.2.	Muestras de origen animal.....	87
2.3.1.3.	Muestras de origen vegetal.....	98
2.3.1.4.	Suelos, fangos y sedimentos.....	99
2.3.2.	Métodos de análisis cromatográficos.....	101
2.3.2.1.	Cromatografía líquida.....	101
2.3.2.2.	Cromatografía de gases.....	104
2.3.2.3.	Cromatografía de capa fina.....	105
2.3.3.	Métodos de análisis no cromatográficos.....	106
2.3.3.1.	Electroforesis capilar.....	106
2.3.3.2.	Métodos biológicos.....	107
2.3.3.3.	Biosensores.....	111
3.	Aim of research.....	119
4.	Publicaciones científicas.....	123
4.1.	<i>Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs.....</i>	133
4.2.	<i>Preparation of antibodies and development of a sensitive immunoassay with fluorescence detection for triazine herbicides.....</i>	143
4.3.	<i>An SPR biosensor for the detection of microcystins in drinking water.....</i>	157
4.4.	<i>Automated portable array biosensor for multisample microcystin analysis in freshwater samples.....</i>	171
4.5.	<i>Dextran–Lipase conjugates as novel tools for low molecular weight ligand immobilization in microarray development.....</i>	181
5.	Discusión integradora.....	211
5.1.	Desarrollo de un método de tratamiento de muestra basado en extracción con disolventes presurizados (PLE), para el análisis de residuos de fluoroquinolonas en huevos.....	213
5.2.	Desarrollo de biosensores ópticos para la determinación de contaminantes medioambientales de origen natural o antropogénico.....	222
5.2.1.	Desarrollo de un fluoroinmunosensor para el análisis en línea de pesticidas triazínicos en aguas superficiales.....	222
5.2.2.	Desarrollo de biosensores ópticos para la determinación de microcistinas en aguas.....	238

---

5.2.2.1.	Desarrollo de un biosensor basado en SPR para la detección de microcistinas en agua potable.....	238
5.2.2.2.	Desarrollo de una micromatriz de biosensores para la determinación de microcistinas en aguas superficiales .....	249
5.2.2.3.	Síntesis, caracterización y aplicación de conjugados proteicos de microcistina-LR para el desarrollo de biosensores ópticos.....	259
5.3.	Desarrollo de plataformas biosensoras multianálito para la determinación simultánea de triazinas, fluoroquinolonas y microcistinas en aguas superficiales .....	273
5.3.1.	Funcionalización de la guía de onda en dos etapas.....	274
5.3.1.1.	Optimización del <i>microarray</i> para la determinación de triazinas ....	276
5.3.1.2.	Optimización del <i>microarray</i> para la determinación de fluoroquinolonas .....	280
5.3.1.3.	Análisis multianálito .....	283
5.3.2.	Funcionalización de la guía de onda en una única etapa: síntesis y caracterización de conjugados BTL2-dextrano-2f, BTL2-dextrano-CIPRO y BTL2-dextrano-biotina .....	287
5.3.2.1.	Síntesis y caracterización de conjugados.....	287
5.3.2.2.	Aplicación de los conjugados al desarrollo de una micromatriz de sensores para el análisis simultáneo de fluoroquinolonas y triazinas.....	293
6.	<i>Conclusions</i> .....	301
7.	Bibliografía.....	309
8.	Abreviaturas .....	343



## SUMMARY

---



The presence of chemical and natural contaminants and residues in food and environmental waters is a problem of major concerns nowadays with important implications for public health and safety. The use of veterinary medicines in food animal production, to treat and control disease, or to protect and improve the health of animals, may result in the presence of residues of these drugs in foodstuffs of animal origin. Moreover, the compounds, their metabolites or degradation products, can be released into the environment both directly, such as for example after the use of medicines in fish farms, or indirectly via the application of animal manure, containing excreted products, to land leading to water and soil contamination. The presence of residual amounts of antimicrobials in foods of animal origin can increase the risk of food-borne antibiotic-resistant pathogenic bacteria and the appearance of allergic reactions in the consumers with the corresponding risks on human health. At the same time, the presence of antimicrobials in the environment can lead to the emergence of resistant bacteria, a reduction of microorganisms susceptible to the agents and to dramatic alterations in the biodiversity of the affected ecosystems.

Similarly, as a result of the treatment of crops with herbicides for weed control, residues of these compounds may remain in the collected foods or be released into the environment, as in the case of antimicrobials, contaminating soils, surface or ground waters. This is also a matter of public concern due to the negative effects that these compounds may have on human or animal health and on the environment as well. Moreover, environmental pollution from persistent herbicides may also be a source of contamination for food.

Besides of the presence of persistent anthropogenic chemicals in the environment the appearance of natural toxins may also be harmful for human or animal health. This is the case of microcystins, a family of hepatotoxins produced by cyanobacteria (blue-green algae).

Therefore, the aim of this Thesis has been the development of new analytical tools for the analysis of fluoroquinolones (FQs), a class of antimicrobials, in food of animal origin (table eggs), and the analysis of natural toxins (microcystins, MCs), herbicides (triazines, TRZs) and FQs in water.

The **first paper** describes the development of a method for the simultaneous determination of three FQs namely, enrofloxacin (ENRO), ciprofloxacin (CIPRO) and, sarafloxacin (SARA) in whole eggs, applying pressurized liquid extraction (PLE) and liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FLD). The influence of several extraction parameters (e.g. extraction solvent, temperature, extraction time and type of



dispersion agent) on FQs extraction efficiency and co-extracted matrix interferents was evaluated, and the results confirmed that extraction efficiency depends mainly on solvent composition. The optimized procedure employed a mixture of phosphate 50 mM, pH 3.0/acetonitrile (50:50, v/v) as extraction solvent, 50% flush volume, 5 min of static time and three extraction cycles at 70 °C and 1500 psi. The application of PLE yielded recoveries comparable to the most commonly applied extraction methods (69 – 90%) of the target FQs from the egg matrix, providing good accuracy and precision values (RSD < 11%). Moreover, the extraction process was fully automated and the obtained extract could be analyzed by HPLC-FLD without further clean-up. The analytical method was validated according to the guidelines of the Directive 96/23/EC. The decision limit ( $CC_{\alpha}$ ) and detection capability ( $CC_{\beta}$ ) were within the range of 17 – 24 ng g<sup>-1</sup> and 30 – 41 ng g<sup>-1</sup>, respectively, showing that the method could be useful for the determination of FQs residues in contaminated eggs and for the screening of illegal use of FQs in laying hens. The method was successfully applied to the determination of ENRO, and its biologically active metabolite CIPRO, in incurred egg samples from ENRO-treated hens and applying LC-MS has been used for confirmatory purposes.

The **second paper** reports the development of an automated flow-injection immunoassay for the determination of s-triazine herbicides in freshwater samples. To this aim, specific polyclonal antibodies against this family of herbicides were obtained immunizing rabbits with an immunogen prepared in the lab by coupling a home-synthesized hapten derivative of simazine (SIM) to lysine groups of KLH (*keyhole limpets hemocyanin*) carrier protein. The sensitivity of the obtained antisera was characterized in an optimized ELISA format with a battery of six enzyme tracers (ETs) derived from triazine structures. The antisera As8 and the HRP-2f tracer, that provided the best assay sensitivity for SIM (detection limit  $0.11 \pm 0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $IC_{50} 0.88 \pm 0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ ), were applied to the development of the flow-through immunoassay. The automated assay is based on a direct competitive immunosorbent assay and fluorescence detection, in which triazine herbicide competes with a horse radish peroxidase (HRP) labelled SIM derivative for the binding sites of the novel anti-SIM antibodies. Immunocomplexes formed in solution were captured in an immunoreactor containing controlled pore glass (CPG) covalently bound to Protein A (Prosep<sup>®</sup>-A Media). Several parameters affecting the immunosensor performance were optimised, including the assay pH, antibody and labeled antigen concentrations, flow rate, the nature of the immunosupport, incubation time for the immunological reaction, and the concentration of the enzyme substrates. The optimized assay presents an  $IC_{50}$  value of  $0.35 \pm 0.04 \mu\text{g L}^{-1}$  with a detection limit of  $0.0013 \pm 0.0009 \mu\text{g L}^{-1}$  and a dynamic range from 0.010 to 7.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  SIM, improving the performance of conventional ELISAs. The

generic nature of the antiserum was shown by good relative cross-reactivities with other triazines compounds such as atrazine (420%), propazine (130%), terbutylazine (6.4%) and desethyl-atrazine (2.2%). No cross-reactivity was obtained for non-related pesticides such as 2,4-D or linuron. The flow injection immunoassay (FIIA) allowed the detection of SIM at the  $\text{ng L}^{-1}$  level and showed excellent precision and short analysis times (30 min per determination, including the regeneration of the immunosupport). The immunosensor was reused for more than 350 cycles without significant loss of activity and was successfully applied to the direct analysis of SIM in contaminated river water samples at the  $\text{ng L}^{-1}$  level. The results calculated with the immunosensor were fully comparable to those obtained using SPE/HPLC - DAD and SPE/GC - NPD as an alternative techniques.

The **third and fourth papers** are focused in the development of two optical biosensors for the determination of microcystins (MCs) in freshwaters. MCs are cyclic heptapeptides, produced by several bloom-forming cyanobacteria genera (e.g. *Microcystis*, *Planktothrix* and *Anabaena*) that promote the formation of hepatic tumours by chronic ingestion through food or drinking water, also affecting the kidney and the gastrointestinal tract. MCs are most widely found in freshwater (e.g. rivers, lakes, reservoirs) where they are released in substantial amounts after bacterial cell lysis or bacterial death.

In the **third paper**, we describe the development of an SPR-based immunosensor. Initially several assay formats were tested, selecting a competitive inhibition assay for biosensor development as it provided the best results in terms of sensitivity. In this approach the target MCs in the sample compete for the anti-MCLR monoclonal Ab binding sites with MCLR covalently attached to the amine-alkanethiol-self-assembled monolayer (SAM) functionalized SPR chip. After the selection of the assay format, the influence of several factors affecting sensor performance namely, the nature and concentration of antibody, the composition of the carrier buffer, blocking and regeneration solutions were evaluated. The optimized SPR biosensor provides an  $\text{IC}_{50}$   $0.67 \pm 0.09 \mu\text{g L}^{-1}$  and a detection limit of  $73 \pm 8 \text{ ng L}^{-1}$ , lower than those reported for other SPR-based devices, and a dynamic range for MCLR in the range of  $0.2$  to  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  for MCLR. Besides MCLR, the biosensor showed excellent cross-reactivity for other MCs variants, such as microcystin-RR (MCRR, 88%) and microcystin-YR (MCYR, 94%) which are, together with MCLR, the most abundant in Spain. The SPR biosensor can perform four simultaneous determinations in 60 min and each SPR chip can be reused for at least 40 assay-regeneration cycles without significant binding capacity loss. The biosensor was successfully applied to the direct analysis of MCLR in drinking

water samples, below the provisional guideline value of  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  established by the World Health Organization (WHO) for such matrices.

Recent improvements in biosensor instrumentation have favored the commercialization of fully automated and portable devices, which can favorably compete with laboratory instrumental techniques, especially for field measurements. The fourth publication describes the application of a ready portable, low cost and easy-to-use array biosensor to MCs monitoring in environmental waters. The instrument is a licensed version of a laboratory prototype developed at the US Naval Research Laboratory (NRL) Array Biosensor and has the ability to perform multiple analyses on a single sensing surface, enabling on-site field applications for simultaneous multisample and/or multi-analyte detection. The sensing surface consists of MCLR covalently immobilized onto the surface of a planar waveguide (microscope slide). The binding of anti-MCLR monoclonal antibodies, spiked in the sample, to the immobilized MCLR is competitively inhibited by MCs in the sample solution. The amount of antibody bound to the patterned antigens is revealed using Cy5-labeled rabbit anti-mouse IgG and evanescent wave excitation, and the fluorescent signal is inversely proportional to the concentration of MC in the samples. Surface chemistry was optimized to improve biosensor performance in terms of sensitivity, regeneration ability and to avoid non specific binding for further application to environmental monitoring. Additionally, the effect of several parameters influencing immunoassay performance was studied, including anti-MC antibody concentration, and nature of the blocking and regeneration solutions. The optimized biosensor assay presents an  $\text{IC}_{50}$  value of  $0.34 \pm 0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ , a detection limit of  $16 \pm 3 \text{ ng L}^{-1}$  and a dynamic range from  $0.06$  to  $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$  MCLR, improving the performance of previously reported devices, including the SPR-biosensor described in the present Thesis. Moreover, it shows acceptable stability, reusability (at least 15 assay-regeneration cycles with the same chip) and excellent precision. The configuration of the instrument applied in this work allows the simultaneous analysis of up to six samples within short analysis times (one complete measurement-regeneration cycle can be accomplished in 70 - 60 min), and the system is fully automated, portable, and highly competitive with laboratory techniques. As expected, the biosensor showed excellent cross-reactivity for other MC variants, such as MCRR (90%), microcystin-RR desmethylated (dm-MCRR, 95 %) and MCYR (91%), which appear together with MCLR in environmental waters, whereas non related compounds that may be present in surface waters, such as pesticides (e.g. atrazine, carbaryl) or antibacterials (e.g. enrofloxacin, chloramphenicol) were not recognized by the antibody (CR < 0.002%), in the studied concentration range ( $0$ – $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ). The immunosensor was successfully applied to the direct analysis of MCs in naturally

contaminated lake and river water samples without any clean-up or preconcentration steps and the results were fully comparable to those obtained by SPE-HPLC-MS/MS as an alternative technique.

Despite of the increasing popularity of microarray technology in many fields, substrate functionalization remains a critical step in array fabrication. Coupling of biorecognition elements to the transducer surface is still a key step in the development of these devices. During the development of the optical immunosensors for detecting MCs in environmental waters, described in works 3 and 4, we found hapten immobilization onto the chip surface and homogeneity of the receptor layer to be critical for biosensor performance, strongly affecting sensitivity, and also nonspecific binding when working with complex sample matrices. Therefore, a novel protocol for the immobilization of MCLR on planar waveguides was optimized and this work is reported in the **fifth paper**. The protocol is based on the covalent binding of the toxin to home-synthesized aminated-dextran-lipase conjugates. The chimeras were prepared by immobilizing bacterial thermoalkalophilic lipases (BTL2) on agarose macroporous beads, followed by covalent coupling to dextran networks without affecting neither the hydrophobic pocket of the enzyme, responsible for its catalytic activity, as it is protected by the support, nor its adsorption properties onto hydrophobic substrates. After dextran-BTL2 coupling, the polysaccharide network was modified with ethilendiamine, to introduce primary amine group which allow the subsequent binding of haptens containing carboxyl groups, such as MCLR, via carbodiimide. Effective BTL2 modification with the polysaccharide network was confirmed by Raman and FTIR spectroscopies.

The aminated-dextran-BTL2 conjugates were immobilized via nonspecific hydrophobic interactions onto glass planar waveguides modified with 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane, obtaining a ordered conjugate monolayer, as confirmed by Atomic Force Microscopy (AFM). MCLR was covalently bound to the aminated-dextran network of the conjugates, without compromising the stability of the conjugate monolayer, as also confirmed by AFM. The MCLR-dextran-BTL2 coated platforms were applied to the development of immunosensor arrays for MCs monitoring in environmental waters, based on a competitive inhibition assay, where MCs in sample compete with MCLR attached to the transducer surface, for the antibody binding sites.

The influence of the dextran molecular weight (1.5 - 40 kDa) on the microarray sensitivity and analytical response range was examined, and the results were correlated with the formation of 2D or 3D immobilization layers on the sensing platform. Surface modification with conjugates bearing dextrans with molecular weights  $\geq 6$  kDa provides a flexible and hydrophilic 3D layer, effectively increasing the loading capacity by effect

of the hapten binding to the polymeric structure as opposed to the surface alone, and ensuring the availability of a high percentage of hapten binding sites, and hence leading to a broader DR, and lower LODs and  $IC_{50}$  values. The effect of several parameters influencing immunoassay performance, including anti-MC antibody concentration, was studied as well. The optimized microarray biosensor presents an  $IC_{50}$  value of  $4.4 \pm 0.7 \text{ ng L}^{-1}$ , a detection limit of  $7 \pm 1 \text{ pg L}^{-1}$  and a dynamic range from 0.09 to  $136.56 \text{ ng L}^{-1}$ , substantially improving the performance of previously reported devices, including the MCs biosensors described previously.

Research into the potential application of the chimeras for multiplexed analysis of low molecular weight compounds using microarrays is described in the **final section** of this Thesis work. To this aim, dextran-BTL2 conjugates modified with different functional groups (e.g. primary amine and epoxy groups) were synthesized and applied to the development of immunoarrays for the simultaneous determination of MCs, TRZs and FQs in water samples.

Aminated and epoxydated-dextran-BTL2 conjugates were immobilized onto specific sections of the planar waveguide. Later on, MCLR and a simazine derivative (2f) were covalently bound to the immobilized aminated-dextran-BTL2 conjugates, and CIPRO was covalently bound to the immobilized epoxydated-dextran-BTL2 conjugates. A multiplexed competitive assay was optimized for the simultaneous detection of MCLR, ENR and ATR using fluorescence detection and the automated array biosensor. No significant cross-reactivity was observed neither between the antibody-antigen pairs included in the study nor with other antibiotics or toxins at the concentration levels usually present in water samples. The optimized multianalyte biosensor shows detection limits of  $0.11 \pm 0.04 \text{ ng L}^{-1}$  for ENRO,  $0.09 \pm 0.05 \text{ ng L}^{-1}$  for ATR and  $0.007 \pm 0.001 \text{ ng L}^{-1}$  for MCLR, improving the performance of previously reported devices. The microarray was applied to the analysis of spiked tap water samples, which were checked previously not to contain the analytes at levels over the method detection limit, and no matrix effect was observed in any case.

In an effort to simplify the transducer surface functionalization procedure, decreasing the preparation time, dextran-BTL2 conjugates previously functionalized with the desired hapten were synthesized and purified for further functionalization of the planar waveguides. As a proof of concept, two haptenic conjugates were prepared, namely: ENRO-dextran-BTL2 and 2f-dextran-BTL2. Effective conjugation of ENRO and SIM derivate (2f) was confirmed by high-resolution X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), by detecting the presence of F and Cl, respectively. These chimeras were applied to the development of a microarray biosensor for the simultaneous determination of

FQs and TRZs in waters. Additionally, a biotin-dextran-BTL2 conjugate was prepared and applied as positive control.

The effect of several parameters on immunoassay performance, including concentration of coating conjugates and antibodies, was optimized. Due to the cross-reactivity characteristics of the selected antibodies, the method allowed the detection of ENRO, CIPRO, SARA, ATR and SIM. The microarray was applied to the analysis of spiked water samples. The results confirm the effectiveness of our approach for the development of highly sensitive biosensing platforms. This strategy provides an alternative method for the preparation of high density receptor layers on glass microscope slides largely independent of surface morphology. Moreover, the chimeras can be stored in the lab and immobilized afterwards “in situ”, by simple incubation with the planar waveguide, combining those conjugates corresponding to the targets to be detected for the selected application.



# INTRODUCCIÓN

---





## 2.1. Contaminantes en alimentos y en el medio ambiente.

La contaminación de los alimentos y el medio ambiente es un problema general que afecta a la población mundial. El hombre emplea gran variedad de productos químicos en las actividades productivas (e.g. agricultura, ganadería, industria) a fin de obtener el mayor rendimiento posible. La eliminación inadecuada de dichas sustancias, o su acumulación incontrolada, pueden originar graves problemas tales como la contaminación de los recursos naturales, incluidos aguas, suelos y atmósfera, o de los alimentos, con las consiguientes repercusiones negativas sobre la salud humana, animal y/o la sostenibilidad ambiental. En algunos casos, la concentración de contaminante a la que se encuentran expuestos los seres vivos es elevada, originando intoxicaciones agudas que, en ocasiones, resultan fatales y conducen al fallecimiento de los individuos. No obstante, en general, las exposiciones se producen a dosis bajas aunque deberían resultar inocuas, cuando se producen de forma continua o crónica, durante un periodo de tiempo prolongado, pueden dar lugar a la respuesta tóxica.

En las últimas décadas se ha incrementado notablemente el interés sobre la seguridad alimentaria y ambiental, realizándose grandes esfuerzos económicos y legislativos con el objetivo de mejorar los sistemas empleados para garantizar su control. Es por ello que la Unión Europea ha fijado unos valores de concentración máxima para los contaminantes más habituales, que establecen el nivel de contaminante que puede contener una determinada matriz (e.g. alimento, pienso, agua), para que la exposición a la misma sea toxicológicamente aceptable para el hombre, los animales y/o la fauna.

Sin embargo, el cumplimiento de la normativa requiere disponer de las herramientas analíticas adecuadas, que permitan identificar y cuantificar, de forma fiable, la presencia de dichas sustancias en distintas matrices. Al mismo tiempo, en muchos casos, la necesidad de realizar de forma rutinaria un gran número de análisis requiere disponer de metodologías sencillas, fáciles de automatizar y disponibles a bajo coste, al alcance de distintos usuarios. Finalmente, la posibilidad de emplear dispositivos analíticos como los sensores, que permitan el análisis *in situ* de dichas sustancias, ha supuesto una ventaja adicional, especialmente para el análisis mediambiental, al disminuir el tiempo de espera entre la aparición del contaminante y la detección del mismo.

### 2.1.1. Origen y clasificación.

Se denomina contaminación o polución a la introducción, en el medio natural, de sustancias que pueden ocasionar efectos negativos en los seres vivos, en los ecosistemas

y/o en los materiales [1]. La gran variedad de contaminantes existentes hace compleja su clasificación atendiendo a su naturaleza química. Por ello, estas sustancias se suelen agrupar en función de la fuente de contaminación, el medio receptor o el impacto ambiental causado.

Atendiendo a la **fuentes de contaminación**, se clasifican en contaminantes naturales (sustancias originadas por fenómenos que suceden en la naturaleza, ajenos a la actividad humana, tales como erupciones volcánicas, incendios naturales, episodios de eutrofización, etc.) y contaminantes de origen antropogénico (generadas por actividades tales como la agricultura y ganadería, la generación de electricidad, el transporte, la minería y metalurgia, la industria química, etc).

En función del **medio receptor** en el que transcurre su existencia, o la mayor parte de ella, es posible distinguir entre contaminantes del aire (tanto contaminación estratosférica, atmosférica, urbana y contaminación en interiores), contaminantes de aguas (superficiales, subterráneas, marinas), contaminantes del suelo, contaminantes de alimentos, etc.

Por último, atendiendo al **impacto ambiental** que provocan, pueden encontrarse contaminantes que causan efecto invernadero, acidificación, destrucción del ozono estratosférico, formación de *smog*, eutrofización, toxicidad humana y ecotoxicidad.

Dado que una misma fuente puede emitir más de un contaminante, y que un contaminante puede provenir de más de una fuente, estar presente en más de un medio y originar más de un impacto ambiental, no es fácil modelizar la contaminación.

Como se ha indicado anteriormente, el número de contaminantes que pueden encontrarse en el medioambiente y/o en los alimentos es elevado. La presente tesis doctoral se ha centrado en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de tres grupos de contaminantes orgánicos con características y efectos muy diferentes: herbicidas de la familia de las triazinas; las microcistinas que se enmarcan dentro del grupo de las toxinas naturales; y los antimicrobianos de la familia de las fluoroquinolonas, empleados como medicamentos de uso humano y veterinario.

### 2.1.2. Riesgos asociados a la presencia de contaminantes.

La presencia de contaminantes y la exposición del ser humano a los mismos representan un riesgo potencial para la salud. Este riesgo y su gravedad dependerán, entre otros factores, de la naturaleza del contaminante (su toxicidad) y del grado de exposición al mismo (concentración, tiempo, etc).

### 2.1.2.1. Medicamentos de uso veterinario.

La eficacia de la cría intensiva de animales destinados a la producción de alimentos para el consumo humano ha mejorado notablemente en las últimas décadas gracias a diversos factores entre los que se incluye la selección genética, las mejoras introducidas en la nutrición y la gestión de las explotaciones ganaderas y, por supuesto, la medicina veterinaria preventiva.

Los medicamentos de uso veterinario se emplean con fines terapéuticos, zootécnicos o como promotores del crecimiento en la cría intensiva de animales de granja y en acuicultura. Los medicamentos veterinarios, en principio, no presentan una toxicidad intrínseca para el hombre. Sin embargo, su uso rutinario representa un riesgo potencial para los consumidores debido a la posibilidad de que aparezcan residuos de los mismos por ejemplo, en la carne, la leche o los huevos producidos por el animal tratado. En muchos casos, estos medicamentos conservan su capacidad farmacológica en humanos tras el consumo de los productos contaminados y pueden provocar riesgos sanitarios [2].

La aparición de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal se debe, en muchas ocasiones, a una mala práctica en su uso, bien porque el fármaco, la dosis y/o el modo de administración elegidos no son los adecuados, o porque no se han establecido correctamente (o no se han respetado) los periodos de espera entre la administración del fármaco y la explotación del animal tratado.

En los últimos años se ha generado una preocupación creciente en relación al empleo de antimicrobianos en la cría de animales destinados a la producción de alimentos, al llevar asociado una serie de riesgos entre los que se incluyen la aparición de residuos de los mismos (o sus metabolitos) en los alimentos de origen animal y la transferencia de bacterias fármaco-resistentes a través de la cadena alimentaria. El consumo de alimentos contaminados con residuos de estas sustancias, o sus metabolitos, puede desencadenar procesos alérgicos en las personas y contribuir a la selección de bacterias fármaco-resistentes en el intestino humano. Además, la aparición de cepas bacterianas resistentes [3], relacionada en numerosos estudios con el uso de antimicrobianos en animales, supone un problema en el tratamiento clínico de enfermedades infecciosas, ya que muchos de los antimicrobianos de primera elección pierden su efecto, siendo necesaria la investigación de nuevas alternativas terapéuticas [4,5].

Por otro lado, la bioacumulación de los antibióticos en los residuos ganaderos (estiércol, purines, etc) puede originar problemas de contaminación de aguas y suelos [6]. Es por ello que los antibióticos se encuentran incluidos dentro del grupo de contaminantes medioambientales emergentes, como compuestos farmacéuticos activos

[7], siendo de gran interés todos los aspectos relacionados con su presencia, transporte y degradación en el medioambiente.

#### **2.1.2.2. Plaguicidas.**

Los plaguicidas, también conocidos como pesticidas, son sustancias o mezclas de sustancias que se aplican tanto sobre el terreno como sobre el propio cultivo con el fin de controlar, destruir, prevenir, repeler o limitar la acción de plantas, microorganismos o animales que puedan afectar al desarrollo, rendimiento y conservación de los productos cultivados. En algunos casos, los plaguicidas también se emplean para eliminar los parásitos que afectan a ciertos animales. Estos compuestos pueden permanecer en pequeñas cantidades, denominadas residuos, en o sobre frutas, vegetales, granos y otros alimentos, así como en los suelos del cultivo, pudiendo ser absorbidos, posteriormente, por las plantas que crecen en ellos. Por otra parte, desde los suelos pueden transportarse, por disolución o arrastre mecánico, bajo la influencia del agua (precipitaciones atmosféricas) y llegar a aguas subterráneas, contaminando los medios acuáticos y la fauna que los habita. De esta forma pasan a formar parte de la cadena trófica, pudiendo ocasionar problemas de bioacumulación [8,9].

El contacto con plaguicidas puede producir efectos agudos o daños a corto/medio plazo, como irritaciones o quemaduras, problemas digestivos o respiratorios, y reacciones alérgicas o hipersensibilidad, dependiendo de si el contacto se produce a través de la piel, o a través de las vías respiratoria o digestiva. Una vez penetran en el organismo, pueden bioacumularse, suponiendo un riesgo potencial con el tiempo. Así, intoxicaciones crónicas pueden convertirse en problemas importantes para la salud debido a la bioacumulación de pequeñas cantidades aparentemente inócuas que, a largo plazo, han llegado a asociarse con lesiones crónicas del sistema nervioso, cáncer y otros efectos graves.

Un ejemplo es el caso de los herbicidas triazínicos, grupo de contaminantes que incluye simazina (SIM) y atrazina (ATR), presentes en los 10 herbicidas más utilizados en toda Europa. A pesar de la magnitud de su uso, son muy pocos los casos reportados de efectos o daños agudos en humanos, ya que estos compuestos presentan una baja toxicidad para los mamíferos. Sin embargo, su presencia supone siempre un riesgo potencial para la salud, principalmente debido a su tendencia a acumularse en tejidos grasos, y su exposición crónica se ha asociado a la aparición de daños hepáticos, de riñón y corazón, problemas en el desarrollo del feto e incremento de la posibilidad de desarrollar cáncer de ovario.

### 2.1.2.3. Toxinas naturales.

Las toxinas naturales son metabolitos producidos de forma natural por seres vivos, para los que no son peligrosos, aunque pueden resultar altamente tóxicos para otras especies, incluyendo los seres humanos. Entre ellos se encuentran las toxinas producidas por algunos hongos (micotoxinas), por microalgas (ficotoxinas), por bacterias (e.g. toxinas botulínica, tetánica o la enterotoxina estafilococia), por las plantas (e.g. ricina, curare, estricnina) o por animales (e.g. cobratoxina de serpientes) [10]. Las tres primeras categorías se incluyen dentro del grupo de los bio-contaminantes mientras que las dos restantes se consideran componentes inherentes de las plantas o los animales. Hay una preocupación creciente, a nivel mundial, en relación a la aparición de estas toxinas en los alimentos y al papel que pueden jugar en el desarrollo de enfermedades en los seres humanos. En el caso de las micotoxinas, se ha realizado un esfuerzo legislativo importante para regular su presencia en distintas matrices. Sin embargo, los desarrollos analíticos y la investigación en el caso de las ficotoxinas y de las toxinas procedentes de plantas están menos avanzados y requieren una atención prioritaria por parte de la comunidad científica [10].

La eutrofización de los ecosistemas acuáticos, debido al exceso de nutrientes proveniente de aguas residuales, residuos agrícolas, abonos y otros desechos de industrias de ganado, junto con una alta retención del agua, temperaturas elevadas y largos periodos de luminosidad, pueden conducir a la proliferación incontrolada de algas, fenómeno conocido como florecimiento o *bloom* algal. Este fenómeno origina una disminución de la radiación luminosa que llega a zonas más profundas, alterando el funcionamiento del ecosistema. Las floraciones pueden ser desarrolladas por diatomeas, algas verdes, dinoflagelados y cianobacterias [11]. El consumo elevado de oxígeno por parte de las microalgas puede originar condiciones de anoxia y con ello la muerte de los animales acuáticos (e.g. peces, moluscos, crustáceos) que viven cerca del sedimento. La vida de las algas es muy corta y, al morir y descomponerse se consume más oxígeno, agravándose la hipoxia de la zona. Cuando este fenómeno se produce a gran escala, resulta una zona muerta, baja en oxígeno, semipermanente y prácticamente inhabitable. En la página web del *World Resorces Institute* se recoge, en un mapa interactivo, información detallada sobre las zonas costeras en el mundo que han sufrido el impacto de la eutrofización y/o la hipoxia desde 1859 hasta 2012 [12].

Las cianotoxinas son los organismos del fitoplancton que se encuentran con mayor frecuencia en las masas de agua con mayores niveles tróficos. Estos organismos sintetizan en su metabolismo compuestos volátiles que dan un sabor y olor desagradable a las aguas. Sin embargo, el efecto más grave a nivel sanitario, es la síntesis

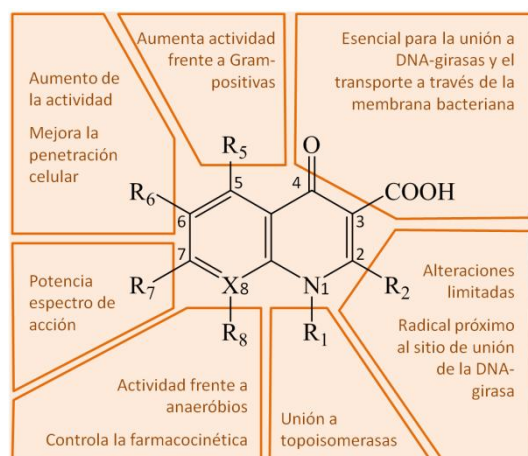
de potentes toxinas, las cianotoxinas, capaces de originar efectos agudos y crónicos en el hombre, en animales y en vegetales. Estas toxinas se consideran los compuestos más tóxicos y preocupantes de las masas de agua, tanto por su amplia distribución como por su elevada toxicidad, y la exposición, incluso a dosis bajas, está asociada a largo plazo con enfermedades tan graves como el cáncer hepático [13].

### 2.1.3. Empleo de antibióticos fluoroquinolonas en medicina humana y veterinaria.

Un antibiótico es una sustancia producida por un microorganismo (e.g. hongos, bacterias) que tiene la capacidad de inhibir el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos por su acción bacteriostática, o de causar la muerte de los mismos por su acción bactericida. Actualmente, esta definición se ha extendido con el fin de incluir tanto las sustancias de origen natural como los derivados semisintéticos y quimioterápicos que se obtienen por síntesis química, y con los que se persigue ampliar el espectro antimicrobiano, reducir la toxicidad para el paciente y/o combatir la resistencia [14].

Los antibióticos, o antimicrobianos en sentido general, deben cumplir como mínimo tres requisitos: presentar actividad antimicrobiana, desarrollar esta actividad a bajas concentraciones y ser tolerados por el huésped. Existe una gran variedad de antimicrobianos, los cuales se clasifican atendiendo a distintos criterios, que se recogen en la Tabla 1.

Uno de los grupos de agentes antimicrobianos más ampliamente utilizado tanto en la práctica clínica como en veterinaria es la familia de las **quinolonas** (Qs), un grupo farmacológico de gran desarrollo en los últimos 25 años [16].



**Figura 1.** Estructura general de las Qs y relación con la actividad bacteriana. Los radicales R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> indican la posición de posibles modificaciones estructurales. X generalmente corresponde a un átomo de C o N.

**Tabla 1.** Criterios de clasificación de los antimicrobianos [15].

Estructura química	Efecto o acción
β-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, etc)	Bacteriostático (inhibición del desarrollo del microorganismo) Bactericida (lisis del microorganismo, efecto irreversible)
Aminoglucósidos	<b>Mecanismo de acción</b>
Tetraciclinas	
Cloranfenicol	Inhibidores de la síntesis de la pared celular
Macrólidos	Inhibidores de la permeabilidad de la membrana plasmática
Lincosamidas	Inhibidores de la síntesis proteica
Glucopéptidos	Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos
Sulfamidas y Trimetoprima	Inhibidores de las vías metabólicas
Quinolonas	<b>Espectro de actividad</b>
Rifampicinas	
Poliénicos (antifúngicos)	
Nitrofurantoínas	
Imidazoles (antifúngicos)	
Etc	

Las Qs son sustancias anfotéricas, con un amplio espectro hacia bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. A diferencia de otros grupos de antibióticos, presentan un efecto rápido al penetrar extremadamente bien en los tejidos y células de mamíferos. Generalmente, se emplean en el tratamiento clínico de infecciones urinarias y diarreas, así como en medicina veterinaria, en el tratamiento de neumonías en terneros y lechones, y para infecciones en aves de corral.

Tienen carácter bactericida actuando como inhibidores de la enzima ADN-girasa (topoisomerasa de tipo II) [17] la cual está implicada en el desenrollamiento, corte y resellado del ADN, por lo que resulta vital para la replicación de los ácidos nucleicos bacterianos [18]. Esta enzima interviene también en el plegamiento y enrollamiento del ADN bacteriano alrededor del centro de ARN, otorgándole la apariencia de bucles o lazos. Además, las Qs pueden inhibir la replicación del DNA por una acción estimulante sobre la topoisomerasa I.

La relación entre la estructura y la actividad antibacteriana de las Qs se muestra en la Figura 1 [19].



La primera Q, el ácido nalidíxico, se descubrió de forma accidental en 1962 como subproducto de la síntesis de la cloroquina [20]. El ácido nalidíxico presenta una baja penetración intracelular, reducido espectro de actividad y su farmacocinética sólo produce una adecuada concentración en las vías urinarias. Con el objetivo de mejorar la actividad antibacteriana y las propiedades farmacológicas, se han realizado distintas modificaciones de la estructura de esta Q que han dado lugar a un numeroso grupo de compuestos.

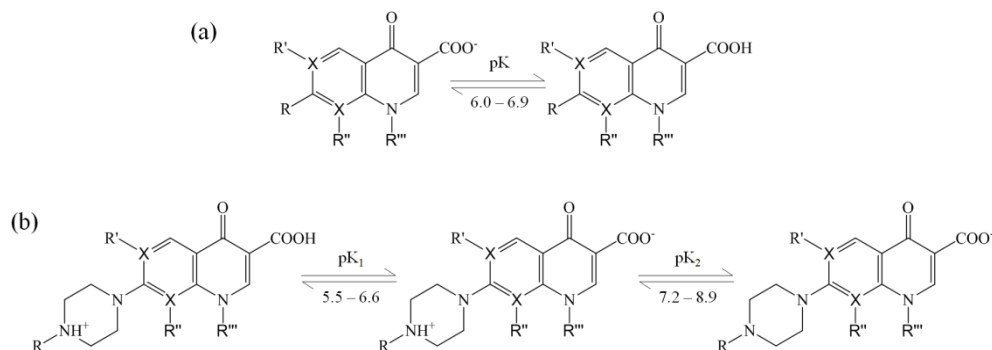
Las Qs se clasifican en generaciones, de acuerdo con el momento de su aparición y el espectro de actividad [18]. Así, se pueden encontrar:

- Qs de **primera generación**. Pertenecen a este grupo el ácido nalidíxico, el ácido pipemídico, el cinoxacino y el ácido oxolínico. Las primeras Qs sintetizadas ofrecían un estrecho margen de actividad microbiana (moderada actividad frente a bacterias aeróbicas Gram-negativas y muy poca o ninguna actividad frente a bacterias aeróbicas Gram-positivas, bacterias anaeróbicas o patógenos atípicos), poca biodisponibilidad oral, distribución limitada en el organismo y gran capacidad para inducir resistencias bacterianas [17].

- Qs de **segunda generación**. La introducción de un átomo de fluor en posición 6 dio origen a las denominadas **fluoroquinolonas** (FQs), entre las que destacan el norfloxacin (NOR), enrofloxacin (ENRO), pefloxacin, ciprofloxacino (CIPRO), sarafloxacin (SARA), levofloxacin, lomefloxacino (LOME) y fleroxacin. El sustituyente flúor en posición 6 permitió incrementar la capacidad de penetración celular y aumentar la afinidad por la ADN-girasa de estos compuestos con respecto a los análogos no sustituidos de primera generación. Otras modificaciones clave hasta llegar a la estructura base de las FQs, a partir de la estructura base del ácido nalidíxico, son la sustitución del grupo CH por N en posición 8 y la introducción de grupos alquilo en R<sub>1</sub> y de un anillo de piperazina en posición 7. Esta sustitución extendió el espectro a bacterias Gram-negativas, incluyendo especies de *Pseudomona*.

Las Qs de segunda generación presentan una mayor actividad frente a bacterias Gram-negativas y patógenos atípicos e incrementan moderadamente la actividad frente a bacterias Gram-positivas. Sin embargo, siguen sin presentar actividad frente a bacterias anaeróbicas.

- Qs de **tercera generación**. Surgieron ante la necesidad clínica de cubrir un espectro antibacteriano más amplio, específicamente contra bacterias Gram-positivas. Se diferencian de las Qs de segunda generación en la posición 7. Se ha visto que la afinidad por la DNA-girasa aumenta de manera directamente proporcional a lo voluminoso del sustituyente en dicha posición. Ejemplos de Qs pertenecientes a la tercera



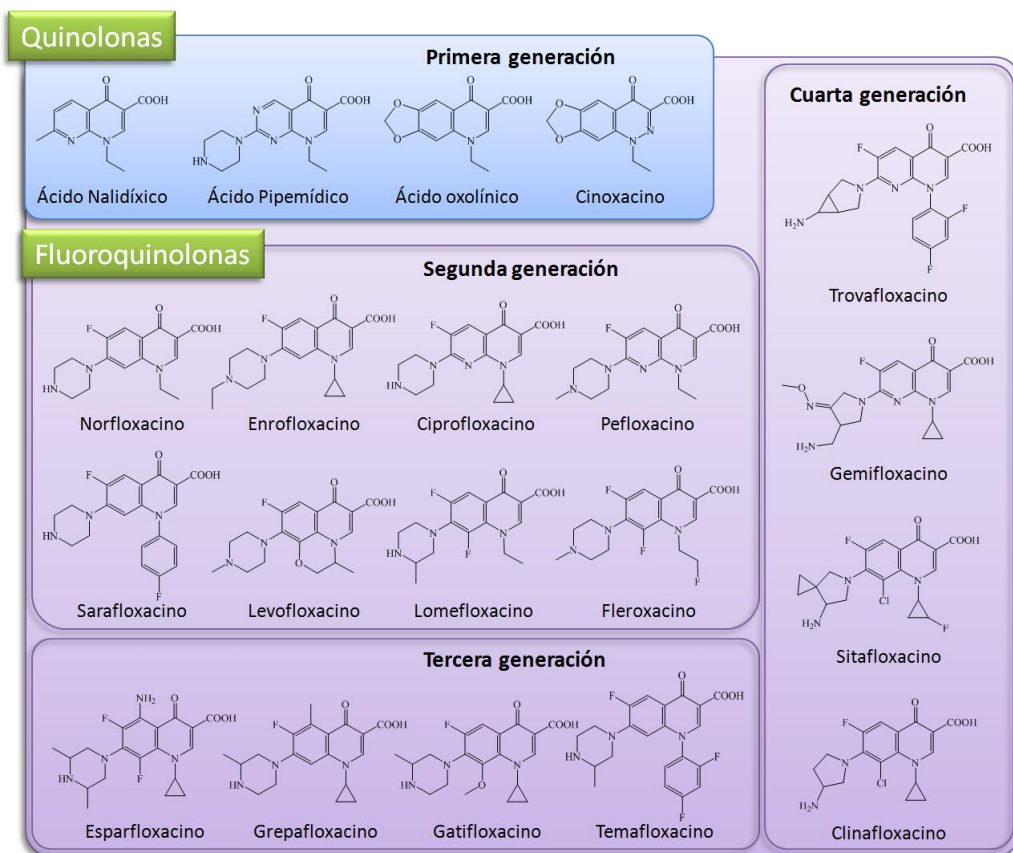
**Figura 2.** Equilibrio ácido-base de las a) quinolonas ácidas y b) 7-piperazinil quinolonas [23].

generación son el esparfloxacino, grepafloxacino, gatifloxacino y temafloxacino. Estos compuestos presentan una actividad mejorada frente a bacterias Gram-positivas, en particular frente a pneumococos, y una buena actividad frente a bacterias anaeróbicas, conservando la actividad frente a bacterias Gram-negativas y patógenos atípicos.

- **Qs de cuarta generación.** Estos nuevos fármacos (trovafloxacino, gemifloxacino, clinafloxacino, sitafloxacino, etc.) presentan un mayor espectro antibacteriano contra pneumococos y microorganismos anaerobios, preservando a su vez el espectro previo de las Qs de tercera generación. Sin embargo, tanto el trovafloxacino como el temafloxacino (de tercera generación), han sido retirados del mercado por sus efectos hepáticos adversos [21,22].

Las Qs de tercera y cuarta generación ofrecen varias ventajas respecto a sus antecesoras, ya que además de presentar un amplio espectro de actividad antibacteriano, también presentan propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas mejoradas: alta biodisponibilidad oral, buena penetración en tejidos, vidas medias plasmáticas relativamente elevadas, etc. Por ello, estos compuestos están indicados para el tratamiento de una amplia variedad de infecciones, no solo urinarias, sino respiratorias, gastrointestinales y ginecológicas, enfermedades de transmisión sexual, prostatitis, e infecciones de piel, tejido blando y huesos.

Las Qs presentan un grupo carboxílico en posición 3, que otorga a estos compuestos un carácter ácido (Figura 2.a). Además, las Qs con el anillo de piperazina en posición 7 presentan grupos amino con carácter básico, lo que provoca que, en disolución acuosa, estos compuestos presenten tres especies en equilibrio (Figura 2.b) [23].



**Figura 3.** Estructura química de distintas quinolonas, agrupadas por generaciones.

En la Figura 3 se muestra la estructura de las Qs mencionadas en esta sección, así como la generación a la que pertenecen.

#### 2.1.4. Empleo de herbicidas triazínicos en agroalimentación.

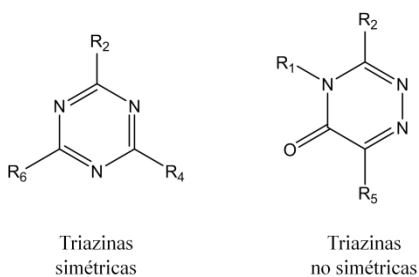
Un herbicida es una sustancia que inhibe o interrumpe el crecimiento y desarrollo de plantas indeseables (*i.e.* maleza o malas hierbas) que pueden crecer junto con los cultivos, limitando la producción agrícola y reduciendo la calidad de las cosechas.

Existe una gran variedad de herbicidas, los cuales pueden clasificarse atendiendo a distintos criterios como el modo y época de aplicación, el mecanismo de acción o su naturaleza química (Tabla 2). El uso de herbicidas en los países industrializados está muy extendido, aplicándose en más del 85% de los cultivos principales como alternativa a la escarda manual utilizada en la agricultura tradicional.

**Tabla 2.** Criterios de clasificación de los herbicidas.

Modo de actuación	Naturaleza química
Selectivos: atacan a las malas hierbas sin afectar el cultivo No selectivos: destruyen toda la vegetación presente en la zona de aplicación, sin discriminar	Compuestos organofosforados Derivados de la urea Derivados del ác. fenoxiacético
Vía de absorción	Compuestos bupiridínicos Compuestos fenólicos
Absorción radicular, a través de las raíces de las plantas Por los brotes Absorción foliar, a través de las hojas de la planta	Nitroanilinas Carbamatos y tiocarbamatos Compuestos triazínicos
Zona de actuación	Mecanismo de acción
Sistémicos: se distribuyen por la planta afectando a zonas de la misma, distintas a la de la aplicación De contacto: destruyen los tejidos de la planta por fitotoxicidad directa afectando a la zona donde se aplican	Inhibición de la síntesis de lípidos Inhibición de la síntesis de aminoácidos Inhibición del crecimiento de las plántulas
Época de aplicación	Reguladores del crecimiento Inhibición de la fotosíntesis Ruptura de la membrana celular Inhibición de los pigmentos Desconocido
Pre-siembra: antes de sembrar Pre-emergencia: después de la siembra, cuando el cultivo no ha emergido Emergencia: cuando el cultivo está brotando Post-emergencia: cuando el cultivo ya se ha desarrollado	

Una de las familias de herbicidas más empleada en agricultura es el grupo de las **trizinas** (TRZs), herbicidas orgánicos de síntesis con una estructura común basada en un anillo triazínico (Figura 4).

**Figura 4.** Estructura general de los herbicidas triazínicos.

Los herbicidas triazínicos se clasifican de acuerdo a su estructura química, en TRZs simétricas (s-TRZs) y TRZs no simétricas [24].

Existen tres clases de s-TRZs, en función del sustituyente  $R_2$ : clorotriazinas ( $R_2$ : Cl), metilmercaptotriazinas ( $R_2$ : SCH<sub>3</sub>) y metoxitriazinas ( $R_2$ : OCH<sub>3</sub>). Las clorotriazinas presentan una solubilidad menor que la del resto de las TRZs (5 a 40 ppm). Fueron introducidas como herbicidas en los años cincuenta. Entre las más empleadas destacan la SIM, propazina, ATR y cianazina. Las metilmercaptotriazinas presentan una solubilidad intermedia, de 50 a 450 ppm, siendo las metoxitriazinas las s-TRZs más solubles (750 a 1.800 ppm). La persistencia de las s-TRZs varía entre 4 y 12 meses, pero si no existen condiciones favorables para su degradación es posible detectar residuos incluso hasta dos años después de su aplicación. Generalmente las clorotriazinas y las metoxitriazinas son más persistentes que las metilmercaptotriazinas. En particular, la ATR y la SIM han causado problemas de fitotoxicidad en cultivos de rotación susceptibles a TRZs.

Las TRZs no simétricas son menos persistentes que las s-TRZs (40-50 días). Presentan alta solubilidad, requiriendo poca humedad para ser efectivas. Entre las TRZs no simétricas destaca la metribuzina.

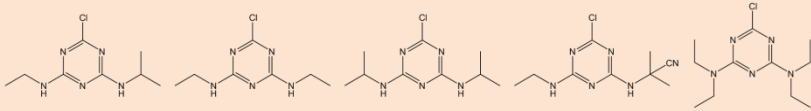
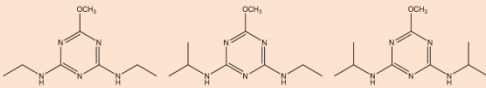
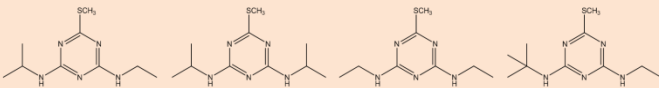
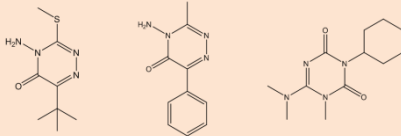
En la Tabla 3 se muestra la estructura de alguno de los compuestos más representativos de cada grupo.

Las s-TRZs son las más empleadas como herbicidas, especialmente la ATR y la SIM. Las s-TRZs son sólidos cristalinos de color blanco a temperatura ambiente, con punto de fusión entre 28 °C (clorazina) y 225 °C (SIM). Son estables en condiciones normales de almacenamiento, tanto en estado sólido como en disolución, aunque, por lo general, se hidrolizan en medios fuertemente ácidos o básicos, especialmente cuando se eleva la temperatura.

Químicamente, las s-TRZs son sustancias polares débilmente básicas. La basicidad depende de los distintos sustituyentes, especialmente del sustituyente  $R_2$ . En general la basicidad de las clorotriazinas ( $pK_a \sim 1.8$ ) es menor que en las metilmercaptotriazinas, siendo mayor en las metoxitriazinas ( $pK_a \sim 4.2$ ) [25]. El efecto de los sustituyentes  $R_4$  y  $R_6$  en el valor del  $pK_a$  no es tan acusado, aunque sí tiene cierta influencia. Por ejemplo, el carácter básico parece aumentar con el incremento de la longitud o la ramificación del grupo aminoalquílico en s-TRZs que sólo difieren en un sustituyente.

Las TRZs se aplican generalmente al suelo (tratamiento de pre-emergencia), donde son absorbidas por el sistema radicular y transportadas hacia las hojas, vía apoplasto (xilema) [24]. Para actuar, requieren ser movilizadas a la zona de las raíces por medio de

**Tabla 3.** Clasificación de los herbicidas triazínicos y estructura química de las principales TRZs.

Triazinas simétricas	
<b>Clorotriazinas</b> <b>(R<sub>2</sub>: Cl)</b>	 Atrazina      Simazina      Propazina      Cianazina      Clorazina
<b>Metoxitriazinas</b> <b>(R<sub>2</sub>: OCH<sub>3</sub>)</b>	 Simetona      Atratona      Prometona
<b>Metilmercaptotriazinas</b> <b>(R<sub>2</sub>: SCH<sub>3</sub>)</b>	 Ametrina      Prometrina      Simetrina      Terbutrina
Triazinas no simétricas	
	 Metribuzina      Metramitróna      Hexazinóna

la lluvia o riego. También se pueden aplicar al follaje con adición de tensioactivos, actuando en este caso como herbicidas de contacto al no poder movilizarse vía simplasto (floema).

El mecanismo de acción de estos herbicidas se basa en la inhibición del proceso fotosintético, interfiriendo en la reacción de Hill. Las TRZs se unen a la proteína D1, localizada en el complejo del fotosistema II, por el mismo sitio de unión de la plastoquinona. Al impedir la entrada de plastoquinona, imposibilitan la formación de plastoquinona reducida, interfiriendo con la transferencia de electrones excitados fuera del fotosistema II. Se provoca así la destrucción de la clorofila y los carotenoides, causando la clorosis, y la formación de radicales libres que destruyen las membranas celulares, por lo que las plantas afectadas presentan como síntomas típicos clorosis foliar, seguida por necrosis y muerte de la planta. Su acción se mide por medio del oxígeno liberado como oxígeno molecular, proveniente de la fotólisis del agua. En

**Tabla 4.** Herbicidas del grupo de las triazinas más usados y principales aplicaciones [28].

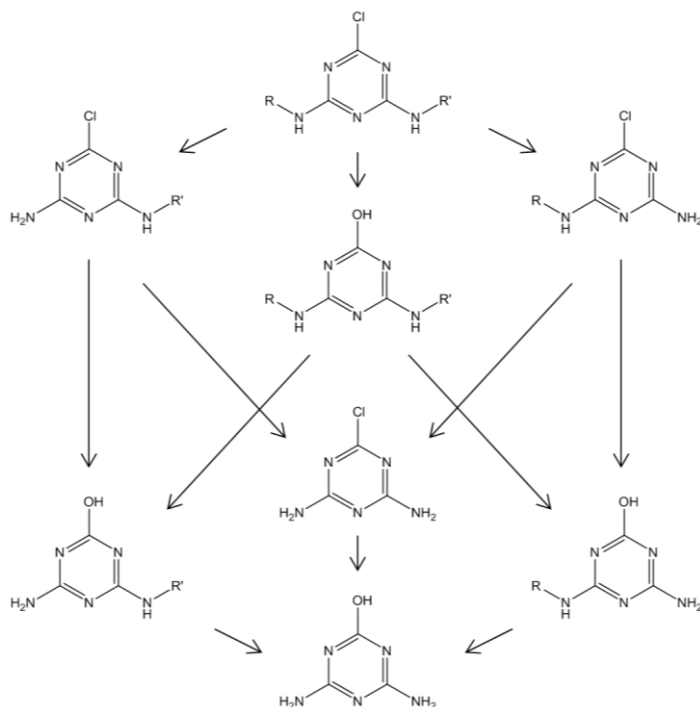
Triazina	Uso
Ametrina	Caña de azúcar, maíz, piña
Atrazina	Maíz, sorgo, caña de azúcar
Hexazinona	Alfalfa, caña de azúcar, silvicultura
Metamitrona	Betabel, otros tipos de remolachas
Metribuzina	Caña de azúcar, patata, soja
Prometona	Sitios no cultivables (para aniquilar malezas de áreas industriales, granjas, etc.)
Prometrina	Algodón, apio, soja
Simazina	Maíz, cítricos, uva, manzana, almendra, nuez, melocotón, pera
Terbutilazina	Maíz, sorgo, uva
Terbutrina	Caña de azúcar, cereales

presencia de estos herbicidas, la producción de  $O_2$  de la fotólisis disminuye o desaparece.

La baja solubilidad en agua y la estabilidad química de las TRZs favorece su persistencia. En el suelo su movilidad es pequeña, tanto por su limitada solubilidad como por su fijación en las arcillas, al adsorberse en la materia orgánica mediante mecanismos de intercambio iónico, interacción por enlace de hidrógeno o a través de radicales libres [26]. Por ello, los compuestos menos solubles se utilizan en suelos arenosos, y los más solubles en suelos más arcillosos. Dada su persistencia, se utilizan en campos donde se requiere realizar un control selectivo y prolongado de la maleza, generalmente en tratamientos de pre-emergencia y, en algunos casos, de post-emergencia. Las TRZs se utilizan para el control de gramíneas anuales y perennes y malezas de hoja ancha [27] (Tabla 4).

En principio, aunque las TRZs son herbicidas no selectivos, existen una serie de plantas como el maíz que poseen enzimas de destoxificación para estos xenobióticos, metabolizándolos y disminuyendo eficazmente su actividad herbicida. Por tanto, la selectividad de estos herbicidas se debe al metabolismo de las plantas.

Además de por ciertas plantas, las TRZs también pueden degradarse por los microorganismos del suelo. Las principales rutas de degradación son la hidroxilación y la N-desalquilación (Figura 5). Estos dos procesos pueden presentarse conjunta o



**Figura 5.** Hidroxilación y N-desalquilación de las clorotriazinas [29].

separadamente. La formación de derivados hidroxilados disminuye el carácter herbicida y la toxicidad de estos compuestos para los animales, propiedades que no se ven afectadas por la desalquilación reductora [29]. La degradación de las TRZs en el suelo depende de varios factores medioambientales, siendo más favorable en condiciones de alta temperatura, alta precipitación y alto contenido de materia orgánica.

La toxicidad de las TRZs para mamíferos es baja comparada con la de otros plaguicidas, ya sea por vía oral, dérmica o inhalatoria. Sin embargo, la exposición a estos herbicidas puede causar debilidad, incoordinación, temblores y convulsiones. También se ha descrito irritación de piel, ojos (lagrimeo) y membranas mucosas, tos y alteraciones respiratorias. Dosis repetidas o prolongadas en contacto con la piel, pueden inducir dermatitis y sensibilidad mediada por las células. Además, estudios de laboratorio han demostrado que la exposición crónica a estos compuestos provoca alteraciones en el corazón, hígado y riñón, posibles malformaciones y retraso en el desarrollo del feto, así como alteraciones hormonales. Se asocia con un incremento en la aparición de tumor de ovario, cáncer de mama y linfoma no-Hodgkin [25,30].



La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasifica la ATR y la SIM como compuestos de categoría 3: no clasificable como carcinógeno en humanos. En 1994, la Agencia de Protección Ambiental (EPA, del inglés *Environmental Protection Agency*) incluyó a las triazinas en el grupo C, *posible carcinógeno en humanos* [31], clasificándolas, posteriormente, como compuestos de grupo N, *no es probable que sea un cancerígeno para los seres humanos* [32].

**2.1.5. Toxinas naturales: microcistinas.**

Las cianobacterias (cloroxibacterias, algas verde-azuladas o cianofíceas) son microorganismos procariotas capaces de realizar una fotosíntesis oxigénica similar a la de las plantas superiores. Aunque aparecen prácticamente en todos los ecosistemas, lo hacen de forma mayoritaria en los medios límnic y marino [33].

Presentan la capacidad de proliferar de forma masiva en eventos denominados, como se ha indicado en el apartado 2.1.2.3, florecimiento o *blooms* algales. Estos eventos ocurren de forma natural en sistemas acuáticos, debido a factores tales como el

**Tabla 5.** Rutas de exposición a toxinas cianobacterianas y actividades con riesgo. Adaptado Refs. [37,40,41].

Vía de exposición	Actividad
Contacto de la piel	Actividades recreativas, contacto directo con la capa superficial, espumas o tapices de cianobacterias tóxicas  Actividades recreativas y/o laborales donde partes del cuerpo, especialmente áreas sensibles (oídos, ojos, boca y garganta), así como áreas cubiertas por el traje de baño, son expuestas a aguas en las que se ha producido un afloramiento de cianobacterias tóxicas o hay toxinas libres. Los trajes de baño (especialmente trajes de buceo) suelen agravar las reacciones dérmicas alérgicas o irritantes al acumular cianobacterias y fomentar la lisis de células y liberación del contenido celular  Baño, ducha con agua tratada conteniendo cianobacterias tóxicas o toxinas libres
Agua de bebida	Ingestión accidental de cianobacterias tóxicas  Bebida de agua natural o tratada contaminada con cianobacterias tóxicas o toxinas libres
Inhalación	Ducha, prácticas laborales, deportes acuáticos
Consumo de alimentos	Moluscos y otros productos de maricultura que hayan estado expuestos a toxinas  Consumo de productos vegetales, si las toxinas se acumulan por riego por aspersión
Hemodiálisis	Exposición al agua de hemodiálisis contaminada por toxinas de cianobacterias

incremento de la temperatura ( $> 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e intensidad luminosa o la estanqueidad del sistema acuático. Sin embargo, se ha registrado un incremento en frecuencia y duración asociado a las condiciones de eutrofización de las masas de agua.

Como se mencionó anteriormente, las floraciones de cianobacterias pueden modificar las condiciones físico-químicas del agua (e.g. pH, cantidad de oxígeno disuelto), llegando a producir olor y sabor indeseables, así como una alteración estética de las masas de agua. Además, se estima que más del 50% de las floraciones a nivel mundial son tóxicas [34], con la capacidad de producir toxinas que llegan a provocar cuadros de intoxicación aguda o crónica en animales y plantas [35-37].

Las toxinas, denominadas cianotoxinas, se sintetizan, en muchos casos, como metabolitos secundarios dentro del organismo unicelular [37]. Se desconoce con precisión cuál es el factor que desencadena la síntesis de toxinas, y se cree que la concentración producida puede estar relacionada no solo con factores ambientales, sino también con diferencias genéticas, ya que se han encontrado distintos niveles de toxicidad tanto entre cepas de diferentes lugares de muestreo, como entre cepas aisladas de una misma proliferación [38,39].

Las principales formas de exposición de los seres humanos a estas toxinas son la ingestión oral, el contacto epidérmico y la inhalación (Tabla 5).

Las cianotoxinas pueden clasificarse atendiendo a distintos criterios. Por ejemplo, en función de su mecanismo de acción, se distingue entre neurotoxinas, hepatotoxinas y dermatotoxinas (Tabla 6); y de acuerdo a sus características químicas pueden agruparse en péptidos cíclicos (microcistinas y nodularina), alcaloides (neurotoxinas y cilindrospermosina) y lipopolisacáridos (LPS) [36].

El grupo más importante de cianotoxinas, tanto por su efecto toxicológico como por su abundancia, es el grupo de las **microcistinas** (MCs), que deben su nombre al microorganismo del que fueron aisladas por primera vez, el género *Microcystis*.

Las MCs son heptapéptidos cíclicos de peso molecular (MW) entre 900 y 1100 Da y de fórmula general ciclo (D-Ala-**X**-D-MeAsp-**Y**-ADDA-D-Glu-Mdha), donde los aminoácidos en posición 2 y 4, denominados genéricamente X e Y, son siempre L-aminoácidos (Figura 6).

Existen más de 80 variantes de MCs [42], que difieren en modificaciones estructurales como la variación de los L-aminoácidos X e Y, así como isoformas generadas por metilación, hidroxilación y epimerización. Esto afecta a la estructura terciaria de la molécula y resulta en diferencias pronunciadas en la toxicidad y en las propiedades hidrofóbicas/hidrofílicas.

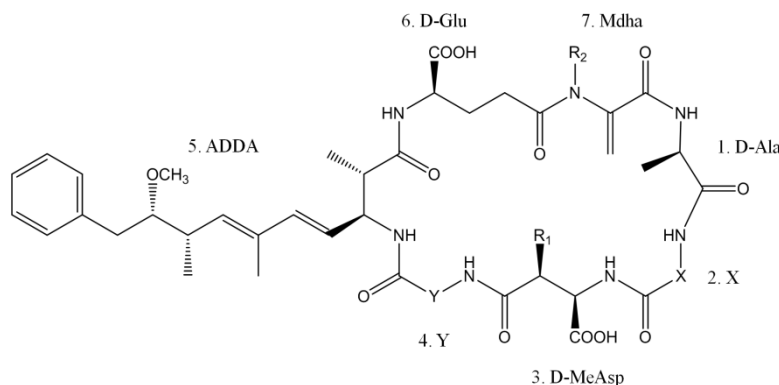
**Tabla 6.** Tipos, origen y propiedades de cianobacterias. Adaptado Ref [37].

Toxina	Géneros productores	Estructura molecular	Mecanismo de toxicidad
<b>NEUROTOXINAS<sup>1</sup></b>			
<b>Anatoxina-a</b>	Anabaena, Microcystis, Oscillatoria, Phormidium, Aphanizomenon	Amina secundaria Alcaloide	Bloqueo de la despolarización post-sináptica
<b>Homoantotoxina-a</b>	Phormidium	Amina secundaria Alcaloide	
<b>Toxinas PSP, (Saxitoxinas, neo-saxitoxinas, Toxinas GTX y GTX)</b>	Aphanizomenon, Anabaena	Alcaloides	Bloqueo de los canales de sodio
<b>Anatoxina-a (s)</b>	Anabaena	Éster de guanidina metil fosfato	Bloqueo de acetil-colinesterasa
<b>HEPATOTOXINAS<sup>1</sup></b>			
<b>Nodularina</b>	Nodularia	Pentapéptido cíclico	Bloqueo de proteínas fosfatasas por enlace covalente, hemorragia del hígado. Posible daño acumulativo
<b>Microcistinas</b>	Microcystis, Anabaena, Nostoc, Oscillatoria	Heptapéptido cíclico	
<b>Cilindrospermosina</b>	Cylindrospermopsis, Umezakia	Alcaloide cíclico guanidina	Bloqueo de la síntesis de proteínas; toxicidad acumulativa sustancial
<b>DERMATOTOXINAS/IRRITANTES<sup>2</sup></b>			
<b>LPS (Lyngbyatoxina A, aplysiatoxina)</b>	Muchos géneros (Lyngbya, Oscillatoria)	Lipopolisacárido	

PSP: Paralytic Shellfish Poisoning. LPS: lipopolisacáridos.

<sup>1</sup>Metabolitos secundarios originados en la formación de fotopigmentos, que se acumulan en el citoplasma.

<sup>2</sup>LPS que forman parte de la pared celular.



**Figura 6.** Estructura química general del grupo de las MCs.  $R_1$  y  $R_2$  son generalmente grupos metilo, presentando una fórmula general ciclo (D-Ala-X-D-MeAsp-Y-ADDA-D-Glu-Mdha). X e Y pueden ser varios aminoácidos, D-Ala es D-Alanina, D-MeAsp es ácido D-eritro- $\beta$ -metil aspártico, ADDA es un aminoácido atípico: 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-ácido dienoico, D-Glu es D-glutamato y Mdha es *N*-metil-dehidroalanina.

La nomenclatura de las MCs se basa en los dos aminoácidos variables X e Y, empleando el código de nomenclatura de una letra para estos dos aminoácidos como sufijo del nombre de las diferentes variantes, denominadas genéricamente “microcistina-XY” (MCXY). Por ejemplo, la microcistina-LR (MCLR), la variante más frecuente, presenta leucina (L) y arginina (R) en posiciones 2 y 4, respectivamente. Cuando hay presente otra modificación, esta se incluye en el nombre de la variante. Este es el caso de la desmetilación en el residuo 3 (D-MeAsp) ó 7 (D-Mdha), en cuyo caso se incorporaría al nombre DAsp<sub>3</sub> o Dha<sub>7</sub> respectivamente. Dentro de las variantes existentes, las toxinas más frecuentes en el ecosistema son las MCs MCLR, MCRR, MCYR y sus variantes desmetiladas en los residuos 3 ( $R_1 = H$ ) y 7 ( $R_2 = H$ ).

Hay dos grandes problemas planteados en torno a las MCs. En primer lugar, se desconoce qué factores desencadenan su síntesis, y en segundo lugar, qué papel fisiológico juegan en la cianobacteria, ya que se trata mayoritariamente de endotoxinas [43]. Hasta ahora se han propuesto varias hipótesis: defensa contra depredadores, implicación en fotosíntesis, molécula quelante de hierro, molécula implicada en señalización o molécula implicada en división celular. Sin embargo, ninguna de estas hipótesis ha sido demostrada, ni completamente descartada, existiendo para cada una de ellas datos experimentales que les sirven de apoyo.

Aunque las MCs se localizan en un 90% en el interior de las cianobacterias que las producen, tras la muerte del microorganismo, se produce la lisis de la célula y las toxinas se liberan al medio. Son moléculas relativamente polares, solubles en agua y,

exceptuando las más hidrofóbicas, incapaces de atravesar directamente la membrana celular sin ayuda de un transportador, lo que hace que no entren en la mayoría de los tejidos. Tras ser ingeridas, se transportan a través del íleon hacia el torrente sanguíneo, por el transportador de ácidos biliares (vía principal de acceso a las células), presente en los hepatocitos y en el epitelio intestinal [44]. Posteriormente se concentran en el hígado por la captación a través de los hepatocitos.

Las MCs inhiben específicamente la actividad de las proteínas fosfatasa (PP, del inglés *protein phosphatases*) de tipo 1 y 2A (PP1 y PP2A), tanto de animales como de plantas superiores, mediante la unión covalente de la toxina, a través del grupo ADDA, a las subunidades catalíticas de dichas enzimas. Una vez que han alcanzado los hepatocitos, provocan la hiperfosforilación de las proteínas hepáticas, dando lugar a la desestructuración del citoesqueleto y causando la deformación hepática con el consecuente colapso de la estructura del hígado [45].

El  $\alpha$ -aminoácido ADDA, común en todas las MCs y también presente en las nodularinas, se considera el principal responsable de la toxicidad de estos péptidos junto con el ácido carboxílico del residuo de D-glutamato en posición 6 y la estructura cíclica [46]. El grupo ADDA se une covalentemente al residuo de cisteína que las enzimas PP1 y PP2A poseen en su centro catalítico. No obstante, no es necesaria esta unión covalente y únicamente es necesario que el residuo de ADDA se sitúe en el bolsillo hidrofóbico del centro activo para inhibir la acción de las enzimas. Modificaciones estructurales de este grupo o su eliminación dan lugar a la desaparición de la inhibición sobre las PP1 y PP2A [47].

Los síntomas clínicos de la intoxicación aguda son poco específicos, mostrando vómitos y diarreas y, como consecuencia de la hipovolemia, palidez, debilidad, extremidades frías y dificultad respiratoria. Los mayores riesgos están en la ingestión de bajas dosis de MCs durante un tiempo prolongado, ya que el daño hepático solo muestra síntomas externos una vez que es severo. Debido a la falta de síntomas aparentes durante la exposición moderada, las personas, no conscientes del peligro, pueden continuar la exposición e incrementar así el riesgo de daño hepático acumulativo. Un consumo crónico de MCs lleva a una degeneración hepática vía necrosis, fibrosis progresiva e incluso tumorigénesis, llegando a provocar la muerte [48]. Se han hecho asociaciones entre el cáncer de hígado y la exposición crónica a la toxina a través del agua potable en algunos pueblos de China [49,50].

Debido a su estructura química, las MCs son muy estables, tolerando variaciones del pH del agua donde se encuentran disueltas. Esto tiene importantes implicaciones en su persistencia en las masas superficiales de agua tras los tratamientos de depuración [36].

Existen numerosos casos de intoxicación letal de animales por beber agua con presencia masiva de cianobacterias (e.g. vacas, perros [51] y aves), destacando las muertes masivas de flamencos observadas en diversos lugares del mundo como España [52], Estados Unidos [53] o Kenia [54,55].

Los registros de intoxicaciones humanas datan desde 1931, como se muestra en los ejemplos recogidos en la Tabla 7. El episodio más grave ocurrió en Brasil, en 1996, donde 150 pacientes de un centro de diálisis estuvieron expuestos a elevadas dosis de MCs, lo que provocó la muerte a 56 de ellos en el término de pocos meses [63,35].

Aunque el número de casos documentados de intoxicación en humanos puede parecer bajo, esto puede deberse a la falta de conocimiento sobre la toxicidad de las cianobacterias que conduce a que los síntomas se asocien en ocasiones, por error, con enfermedades gastrointestinales.

Una vez que se produce la intoxicación por MCs, no existen tratamientos para neutralizar sus efectos. Por tanto, es necesario tomar medidas para la prevención y control de la eutrofización, así como llevar a cabo estrictos análisis y controles de la calidad del agua, que permitan evitar el contacto de la población con estas toxinas.

**Tabla 7.** Ejemplos de intoxicaciones en humanos debido a la presencia de microcistinas. Adaptado Refs [36,56].

Ruta de exposición	Año	Localización	Casos	Síntomas	Ref
Agua de bebida	1931	USA	5000-8000	Gastroenteritis	[57]
	1988	Brasil	2000 (88 letales)	Gastroenteritis	[58]
	1981	Australia	25000	Daño hepático	[59]
Aguas recreativas	1959	Canadá	13	Dolor de cabeza, náuseas, dolor musculares y diarreas	[60]
	1989	Reino Unido	10	Gastroenteritis, garganta irritada, ampollas en la boca, dolor abdominal, fiebre, vómitos, neumonía	[61]
	1995	Australia	852	Gastroenteritis, síntomas similares a la gripe, erupciones en la piel, úlceras en la boca, fiebre, irritación en ojos y oídos	[62]
Hemodiálisis	1996	Brasil	130 (56 letales)	“Síndrome de Caruaru” (problemas visuales, náuseas, vómitos, daño hepático)	[63, 64]

### 2.1.6. Legislación y control de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos.

El empleo de medicamentos veterinarios es necesario para garantizar la salud y el bienestar de los animales. Como se ha indicado anteriormente, los antibióticos se utilizan, por ejemplo, como aditivos en el pienso y en el agua de bebida de animales para facilitar el control de enfermedades. Además, se han empleado como promotores del crecimiento del ganado [65], aunque esta práctica está prohibida en la Unión Europea desde el 1 de Enero de 2006. Sin embargo, su utilización en animales destinados a la producción de alimentos puede dejar residuos en los productos obtenidos a partir de los mismos lo que, como se ha comentado previamente, no está exento de riesgos. Por tanto, es necesario realizar una evaluación de la seguridad de estas sustancias, teniendo en cuenta los riesgos toxicológicos, la contaminación medioambiental, y los efectos farmacológicos y/o microbiológicos no deseados de estos posibles residuos, de cara a proteger la salud de los consumidores.

Debido a la importancia del tema, la Unión Europea, en su **Reglamento N° 2377/90** y sucesivas modificaciones [66], estableció unos Límites Máximos de Residuos (LMRs) para un gran número de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal, definiendo como LMR al “contenido de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario, legalmente autorizado en la UE y considerado como admisible, desde el punto de vista de la seguridad del consumidor, en un producto alimenticio”. De esta forma, una sustancia farmacológicamente activa sólo puede utilizarse en animales si ha sido objeto de una evaluación de riesgo, con base científica y resultado favorable.

Estos LMRs, fijados en función de las características toxicológicas de cada medicamento, sirven también como referencia para determinar el tiempo de espera que debe transcurrir desde la administración del fármaco hasta el sacrificio del animal.

El Reglamento N° 2377/90 del Consejo ha quedado derogado, y actualmente la norma básica que recoge y regula estos LMRs es el **Reglamento (CE) N° 470/2009** del Parlamento Europeo y del Consejo [67]. Este reglamento establece los procedimientos comunitarios para la fijación de los LMRs de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, modificando la Directiva 2001/82/CE [68] y el Reglamento (CE) N° 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo [69]. Tiene dos objetivos fundamentales: 1) la protección de la salud humana y animal y 2) garantizar la disponibilidad de medicamentos veterinarios adecuados para enfermedades que afecten a animales productores de alimentos. Para ello establece que una sustancia farmacológicamente activa sólo podrá utilizarse en animales productores de alimentos

(carne, pescado, leche, huevos y miel) si ha sido objeto de una evaluación favorable por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, del inglés *European Medicines Agency*). En esta evaluación se tiene en cuenta el metabolismo y la eliminación de las sustancias activas, el tipo de residuos, así como la ingesta diaria admisible (TDI, del inglés *Tolerable Daily Intake*) del mismo, obligando a que el dictamen de la EMA considere todo hallazgo científico pertinente de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, del inglés *European Food Safety Authority*). Además, el Reglamento (CE) N° 470/2009 clasifica las sustancias activas y las categorías terapéuticas a las cuales pertenecen, indicando: un LMR, un LMR provisional, la ausencia de establecer un LMR, o bien la prohibición de uso de la sustancia.

De forma complementaria al Reglamento (CE) N° 470/2009, con fecha 20 de enero de 2010 se ha publicado el **Reglamento (UE) N° 37/2010** [70] que recoge los LMRs de sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, contenidos previamente en los anexos I a IV del ya derogado Reglamento (CEE) N° 2377/1990. Como novedades respecto al Reglamento derogado, cabe destacar la creación únicamente de dos listas, en lugar de los cuatro anexos anteriores: 1) LMRs para sustancias permitidas y 2) lista de sustancias prohibidas. Además, se introduce información acerca de la clasificación terapéutica de las sustancias, así como posibles condiciones o restricciones de su utilización.

En la Tabla 8 se recogen los LMRs para las FQs de uso veterinario, objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, en diferentes tejidos y productos animales.

En España, desde la aprobación de las FQs para uso veterinario (ENRO, 1990) [71] se ha producido un aumento notable de los casos de resistencia por infecciones de *Campylobacter*, *Salmonella* y *E. coli*, especialmente grave en el caso de las aves de corral, debido a la amplia utilización de las FQs en la producción avícola. Sin embargo, aún no se han fijado los LMRs para estos antibióticos en huevos, por lo que el Reglamento prohíbe su empleo en las aves ponedoras salvo, excepcionalmente, para el tratamiento de enfermedades que causan la muerte del animal, o cuando se produce un elevado estrés o sufrimiento de las aves. Por tanto, de acuerdo con la legislación actual, debería aplicarse el principio de “tolerancia cero” a la presencia de residuos de antibióticos FQs en esta matriz, ya que su presencia supone un problema de salud pública que se agrava por el hecho de que las FQs sean antibióticos empleados también en medicina humana, y que debe ser controlado.



**Tabla 8.** LMRs establecidos por la Directiva Europea para FQs de uso veterinario [70].

Sustancia activa (Residuo marcador)	Especie animal	LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Tejidos diana
DANO (DANO)	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos, excepto bovinos, ovinos, caprinos y aves (1)	100	Músculo (2)
		50	Grasa (3)
		200	Hígado y riñón
	Bovinos, ovinos, caprinos	200	Músculo
		100	Grasa
		400	Hígado/ Riñón
SARA (SARA)	Aves de corral (4)	30	Leche
		200	Músculo
		100	Piel y grasa (4)
	Pollo	400	Hígado/ Riñón
		10	Grasa (4)
		100	Hígado
DIFLO (DIFLO)	Salmónidos	10	Músculo (2)
		300	Músculo (2)
		100	Grasa
	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos, excepto bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y aves (1)	800	Hígado
		600	Riñón
		400	Músculo
	Bovinos, ovinos, caprinos (6)	100	Grasa
		1400	Hígado
		800	Riñón
	Porcinos	400	Músculo
		100	Piel y grasa (3)
		800	Hígado/ Riñón
ENRO (Suma de ENRO y CIPRO)	Aves de corral (5)	300	Músculo
		400	Piel y grasa (4)
		1900	Hígado
	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos, excepto bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, conejos y aves de corral (1)	600	Riñón
		100	Músculo (2)/ Grasa
		200	Hígado
	Bovinos, ovinos, caprinos	200	Riñón
		100	Músculo/ Grasa
		300	Hígado
	Porcinos y conejos	200	Riñón
		100	Músculo/ Grasa (3)
		300	Hígado
ENRO (Suma de ENRO y CIPRO)	Aves de corral (5)	100	Músculo/ Piel y grasa (4)
		200	Hígado
		300	Riñón
	Bovinos, ovinos, caprinos	100	Músculo/ Grasa
		300	Hígado
		200	Riñón
ENRO (Suma de ENRO y CIPRO)	Porcinos y conejos	100	Músculo/ Grasa (3)
		200	Hígado
		300	Riñón
	Aves de corral (5)	100	Músculo/ Piel y grasa (4)
		200	Hígado
		300	Riñón

Tabla 8. Continuación.

Sustancia activa (Residuo marcador)	Especie animal	LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Tejidos diana
FLUME (FLUME)	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos, excepto bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, aves y peces	200	Músculo
		250	Grasa
		500	Hígado
		1000	Riñón
	Bovinos, porcinos, ovinos, caprinos	200	Músculo
		300	Grasa (3)
		500	Hígado
		1500	Riñón
MARBO (MARBO)	Aves de corral (5)	50	Leche
		400	Músculo
		250	Piel y grasa (4)
		800	Hígado
	Pescado	1000	Riñón
		600	Músculo y piel (2)
	Bovinos	150	Músculo/ Hígado/ Riñón
		50	Grasa
		75	Leche
	Porcinos	150	Músculo/ Hígado/ Riñón
		50	Grasa (3)

CIPRO: Ciprofloxacino; DANO: Danofloxacino; DIFLO: Difloxacino; ENRO: Enrofloxacino; FLUME: Flumequina; MARBO: Marbofloxacino; SARA: Sarafloxacino; (1) Los LMRs en grasa, hígado y riñón no se aplican a los peces. (2) Para peces este LMR se refiere a “músculo y piel en proporciones normales”. (3) Para porcino este LMR se refiere a “piel y grasa en proporciones normales”. (4) Para aves este LMR se refiere a “piel y grasa en proporciones normales”. (5) No debe utilizarse en animales que producen huevos para consumo humano. (6) No debe utilizarse en animales que producen leche para consumo humano.

Además de establecer unas normas que regulen la utilización de los medicamentos veterinarios, son necesarios planes de vigilancia que controlen su cumplimiento. Este es el caso, por ejemplo, del Plan Nacional de Investigación de Residuos (RD 1749/1998) desarrollado en España, cuyo objetivo es controlar la presencia de residuos de productos zoonosanitarios, plaguicidas y contaminantes ambientales en los alimentos de origen animal y verificar la conformidad con los niveles permitidos en la legislación.

Es necesario establecer planes de muestreo y análisis que permitan monitorizar de forma efectiva el empleo de sustancias ilegales o el uso incorrecto de aquellas autorizadas. Cuando se produce un incidente en relación con la Seguridad Alimentaria, el país afectado debe notificarlo inmediatamente a la Comisión y a los demás Estados miembros de forma que se puedan tomar medidas, tales como la interrupción de las

exportaciones o la retirada de la venta de los productos afectados, garantizando la seguridad del consumidor.

### **2.1.7. Legislación y control de microcistinas, pesticidas y residuos de medicamentos veterinarios en aguas medioambientales.**

Existe una amplia legislación que regula la calidad de las aguas. Entre los documentos legislativos, cabe destacar:

- la Directiva 2000/60/CE [72], también conocida como Directiva marco sobre la política de aguas, EU Water Framework Directive o WFD;
- la Decisión 2455/2001/CE [73], que recoge la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas y modifica la Directiva 2000/60/CE;
- el Real Decreto 140/2003 [74] del Consejo, relativa a la calidad de las aguas para el consumo humano;
- la Directiva 91/271/CEE [75] del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas;
- la Directiva 98/15/CE [76] de la Comisión, relativa a aguas residuales; y
- la Directiva 2006/118/CE [77], relativa a la calidad de las aguas subterráneas.

La **Directiva 2000/60/CE** establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Señala la necesidad de llevar a cabo un control periódico y sistemático del contenido de determinados compuestos tóxicos y de sus productos de degradación en las distintas cuencas hidrográficas. Deroga, desde diciembre de 2007, la Directiva 75/440/CEE relativa a la calidad requerida para las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los Estados miembros, y la Directiva 79/869/CEE relativa a los métodos de medición y a la frecuencia de los muestreos y del análisis de las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los Estados miembros. Además, prevé la derogación, para 2013, de las Directivas 78/659/CEE, relativa a la calidad de las aguas continentales que requieren protección o mejora para ser aptas para la vida de los peces; 79/923/CEE relativa a la calidad exigida a las aguas para la cría de moluscos; 80/68/CEE relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas y 76/464/CEE relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad.

La **Decisión 2455/2001/CE** tiene como objetivo clasificar por orden de prioridad las sustancias respecto de las que se establecerán normas de calidad y medidas de control de las emisiones a escala comunitaria. De este modo completa la directiva marco sobre

el agua y se convierte en su anexo X. En la Decisión se proponen 33 “sustancias o grupos de sustancias prioritarias”, que constituyen un riesgo importante para el medio acuático por su peligro intrínseco debido a su ecotoxicidad acuática y toxicidad humana. Es de destacar que 10 de esas 33 sustancias reconocidas son plaguicidas, estando incluidos en la lista tanto la **ATR** como la **SIM**, dos de las s-TRZs de más amplio uso. La lista completa figura anexa a la decisión y es examinada y adaptada por la Comisión Europea cada cuatro años como mínimo, teniendo en cuenta toda la información procedente de los Estados miembros, el Comité Científico de Toxicología, Ecotoxicología y Medio Ambiente (CSTEE, del francés *Comité Scientifique de Toxicologie, Ecotoxicologie et l'Environnement*), la Agencia Europea de Medio Ambiente, los programas comunitarios de investigación, los organismos internacionales de los que forma parte la Comisión, las asociaciones empresariales europeas y las organizaciones de protección del medio ambiente.

El **Real Decreto 140/2003** establece los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Dentro de los parámetros químicos a tener en cuenta, recoge el contenido en plaguicidas, estableciendo un valor paramétrico de  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  para cada plaguicida individual y de  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  para el contenido total (o suma de todos los plaguicidas definidos en el apartado 10 del artículo 2 que se sospeche que puedan estar presentes en el agua), exceptuando aldrín, dieldrín, heptacloro y heptacloro epóxido, con un valor de  $0.03 \mu\text{g L}^{-1}$ , e indicando que las comunidades autónomas son las responsables de que se adopten las medidas necesarias para poner a disposición de la autoridad sanitaria y de los gestores del abastecimiento el listado de plaguicidas fitosanitarios utilizados mayoritariamente en cada una de las campañas contra plagas del campo y que puedan estar presentes en los recursos hídricos susceptibles de ser utilizados para la producción de agua de consumo humano. En este decreto se indica que el método de ensayo utilizado para su detección y cuantificación deberá tener un límite de detección, en el caso de los plaguicidas de, al menos,  $0.025 \mu\text{g L}^{-1}$  (25% del valor paramétrico), y ser capaz de medir concentraciones iguales al valor paramétrico con exactitud y precisión del 25%. Además, el Decreto recoge la necesidad de realizar muestreos periódicos, indicando el número mínimo de muestras para las aguas de consumo humano suministradas a través de una red de distribución o utilizadas en la industria alimentaria.

La **Directiva 91/271/CEE** se refiere a la recogida, tratamiento y vertido de las aguas residuales urbanas, así como al tratamiento y vertido de las aguas residuales de algunos sectores industriales y tiene como finalidad proteger el medio ambiente contra todo deterioro debido al vertido de esas aguas.

La **Directiva 98/15/CE** regula las aguas residuales. Su objetivo es el de establecer requisitos sobre los vertidos de las depuradoras de aguas residuales urbanas con el fin de acabar con las diferencias de interpretación de los Estados miembros. Los principales requerimientos de la legislación son: asegurar los procedimientos adecuados para cada efluente, la gestión adecuada para los fangos producidos, los plazos de construcción de las depuradoras y los tamaños de población que deben contar con una.

Finalmente, la **Directiva 2006/118/CE**, tiene como objetivo el prevenir y luchar contra la contaminación de las aguas subterráneas, evaluando su estado químico, determinando si la concentración de los contaminantes en dichas aguas tiende al aumento y previniendo y limitando los vertidos indirectos de contaminantes en las aguas subterráneas (como resultado de su filtración a través del suelo o del subsuelo). Dado que en el año 2013, la Directiva marco sobre la política de aguas derogará la Directiva 80/68/CEE relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas, otro objetivo de esta Directiva es proteger las aguas y cubrir la laguna legislativa que causará la derogación de la Directiva 80/68/CEE.

En lo relativo a plaguicidas, la Directiva considera que el agua subterránea está en buen estado químico si la concentración medida de “sustancias activas de plaguicidas, incluidos los metabolitos y los productos de degradación y reacción que sean pertinentes” no supera el valor de  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  por compuesto individual o  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  para el total de los plaguicidas medidos, los mismos límites establecidos para otros tipos de aguas (i.e. agua potable).

La ATR es el herbicida más utilizado en el cultivo de maíz en EEUU, pero su uso en la Unión Europea, así como el de SIM, está prohibido debido a los efectos adversos en la salud humana [78,79]. Están clasificados como herbicidas de alto riesgo y como pesticidas de uso restringido en Estados Unidos, debido a su potencial para contaminar aguas subterráneas. La EPA ha establecido un límite recomendado de hasta  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  para ATR y  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  para SIM en agua para el consumo humano [80].

Hasta el momento, no existe ninguna legislación disponible que establezca los límites máximos recomendables para el control de residuos de medicamentos veterinarios, como las FQs, en medioambiente, a pesar de que estudios realizados en los últimos años demuestran la relación existente entre el consumo de antibióticos tanto en medicina humana como en veterinaria y la aparición de bacterias resistentes en el medio acuático, situando a España entre los países con mayor incidencia de bacterias resistentes por el uso abusivo de los antibióticos [81-83].

En lo relativo a MCs, tampoco existe una legislación que establezca los límites máximos de concentración para estas toxinas en aguas superficiales. Sin embargo, en 1998, la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés *World Health Organization*), consciente de los efectos adversos que estas toxinas ejercen sobre la salud humana, estableció un nivel máximo aceptable para el contenido de MCLR en aguas de consumo humano de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  [84]. Este valor se adoptó como valor provisional, con el objetivo de que fuera empleado posteriormente por los países, como referencia para el desarrollo de legislaciones. El cálculo del valor guía se realizó teniendo en cuenta que, la poca información disponible respecto a la toxicidad de las MCs se limitaba a la variante MCLR, la más abundante y estudiada. Partiendo de un estudio realizado en ratones [85], en el cual se determinaba un valor de  $40 \mu\text{g}$  por  $\text{kg}$  de peso corporal como dosis máxima de toxina a la cual no se observa efectos adversos (NOAEL, del inglés *No Observed Adverse Effect Level*), se calculó un valor TDI de  $0.04 \mu\text{g kg}^{-1}$ , aplicando un factor de incertidumbre (UF, del inglés *uncertainty factor*) de 1000, que tiene en cuenta la variabilidad de la sensibilidad entre especies, las diferencias dentro de la misma especie, y la limitación de datos disponibles respecto a la toxicidad crónica y la carcinogenicidad de estas toxinas. Considerando que la principal ruta de exposición es el consumo de agua potable (probabilidad 80%,  $P = 0.8$ ), se calculó un valor guía según la ecuación (1):

$$\text{Valor guía} = \text{TDI} \cdot \frac{P \cdot \text{peso corporal}}{L} = \frac{\text{NOAEL} \cdot P \cdot \text{peso corporal}}{\text{UF} \cdot V_{\text{agua}}} \quad (1)$$

donde se estableció un peso corporal y un consumo de agua promedios de  $60 \text{ kg}$  y  $2 \text{ L}$  por día, respectivamente, obteniéndose un valor calculado de  $0.96 \mu\text{g L}^{-1}$ , que se redondeó a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  [86].

España adoptó este mismo valor como contenido máximo total de MCs en aguas de consumo, medido a la salida de la estación potabilizadora, tal y como está recogido en el Real Decreto 140/2003 [87]. Sin embargo, la legislación no recomienda ninguna metodología ni establece las variantes de MC a medir [13].

Algunos autores consideran necesarios más estudios para confirmar el nivel recomendado por la WHO y proponen un valor de  $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$  en casos de exposición crónica, por la posible relación entre cáncer primario de hígado y la presencia de MCs en el agua [11]. Por otro lado, de confirmarse su posible acción cancerígena, no sería posible establecer un valor guía y las MCs deberían estar completamente ausentes en el agua potable.

Respecto a las aguas de uso recreativo, tampoco existe un valor guía fijado. Sin embargo, la WHO establece una serie de recomendaciones a seguir, en función de la

presencia de células de cianobacterias potencialmente tóxicas. Considerando que un valor guía único no es apropiado, define tres niveles de valores guía asociados con la severidad y probabilidad incrementada de los efectos sobre la salud [56]:

- Nivel guía de  $2 \times 10^4$  células cianobacterianas por mL, correspondiente a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorofila-a con predominio de cianobacterias, a partir del cual existe una *probabilidad relativamente leve o baja* de efectos adversos sobre la salud (reacciones irritantes o alérgicas, enfermedades gastrointestinales). Si las cianobacterias que producen MCs son predominantes, se puede esperar  $2 - 4 \mu\text{g L}^{-1}$  de MC a este nivel de densidad celular, similar al valor guía provisional de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de MCLR para agua potable establecido por la WHO.

- Nivel guía de  $10^5$  células cianobacterianas por mL ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorofila-a con predominio de cianobacterias), a partir del cual existe una *probabilidad moderada* de efectos adversos sobre la salud. A este nivel se puede esperar concentraciones de MC entre 20 - 50 veces el valor guía establecido por la WHO, lo que representaría una cantidad aproximada a la TDI para un adulto que ingiere 100 mL de agua durante actividades recreativas tales como la natación, pero supondría una exposición a una cantidad diez veces mayor si la persona expuesta es un niño.

- Formación de espuma cianobacteriana en las áreas de baño, lo que supone un *riesgo elevado* de efectos adversos sobre la salud, situación en la que se llegan a alcanzar concentraciones de hasta  $24 \text{ mg L}^{-1}$  de MCs en espumas, cuya ingestión accidental, aún en pequeñas cantidades, puede producir un daño severo.

La Unión Europea incorporó en la Directiva Europea 2006/7/CE [88] sobre aguas de baño, “la necesidad de determinar la potencialidad de cada cuerpo de agua para desarrollar proliferaciones masivas de cianobacterias, y en caso de producirse un afloramiento, evaluar los riesgos para la salud que éste supone”. Sin embargo, la directiva no fija los niveles de abundancia de cianobacterias límite, dejando que sean los países miembros los que establezcan dichos niveles. En España, esta directiva se ha traspuesto mediante el Real Decreto 1341/2007 [89], donde se reconoce el riesgo para la salud que conlleva la presencia de cianotoxinas en las aguas de recreo, y la necesidad de llevar a cabo un control adecuado que permita su identificación, aunque tampoco establece valores límite.

En cualquier caso, las medidas de la densidad celular de cianobacterias no bastan para detectar el peligro asociado a su presencia, ya que aún no está claro si se han identificado todas las cianotoxinas importantes.

Debido a la dificultad de establecer una vigilancia adecuada, así como a la escasez de opciones inmediatas de actuación ante una proliferación a excepción de la prohibición

del uso del área de baño, gran parte de la responsabilidad para una práctica segura recae sobre los usuarios. Junto con la implementación de programas de monitorización, es importante promover campañas de información pública, ya que conociendo un riesgo potencial será más fácil identificar y comprender los síntomas producidos a través de la exposición, así como evitarlos.

## 2.2. Biosensores.

Como se ha indicado anteriormente, en las últimas décadas los sensores han despertado un gran interés a todos los niveles: científico, industrial, comercial, e incluso social. Esto se pone de manifiesto al comprobar su importancia en el desarrollo actual de los países industrializados.

Los sensores se utilizan, por ejemplo, en la construcción de edificios inteligentes, diseñados para responder a estímulos tales como fugas de gas, humo y/o agua, al aumento o disminución inesperados de temperatura, ruido u otros parámetros de interés. Actualmente, los sensores son herramientas clave en el diseño de las denominadas *smart cities* [90] o ciudades inteligentes, en las cuales miles de sensores instalados en viviendas y calles permiten un ahorro significativo de costes y del consumo. En la industria del automóvil y en el ámbito de la seguridad vial, los sensores también juegan un papel muy importante, ya que su incorporación en zonas localizadas del vehículo, por ejemplo dentro de la banda de rodadura del neumático, puede proporcionar información al conductor, en tiempo real, sobre el estado de la carretera [91]. Los sensores también se aplican en la industria de la telefonía móvil, el campo farmacéutico, el control de los alimentos, el control medioambiental, seguridad y defensa y, sobre todo, en el área clínica y de la salud. Su diseño y desarrollo es un reto que puede aportar importantes mejoras en la sociedad a todos los niveles.

Desde el punto de vista analítico, los sensores y en especial los biosensores, son una alternativa muy prometedora a los métodos de análisis tradicionales. Su especificidad y alta sensibilidad, corto tiempo de análisis, capacidad de inclusión en sistemas integrados, facilidad de automatización, capacidad de trabajar en tiempo real, versatilidad y bajo coste los convierten en opciones altamente atractivas para competir con otras tecnologías en el ámbito de la química analítica, permitiendo resolver problemas importantes inherentes a una falta de estabilidad de la muestra, alteración de la misma durante el transporte y/o almacenamiento, etc., al aplicarse en la determinación *in situ* de un gran número de especies.

A pesar de que el campo de los biosensores ha experimentado un notable avance en los últimos años, en parte gracias al desarrollo de las diferentes tecnologías implicadas



en su diseño y construcción, la salida de estos dispositivos del laboratorio al mercado es lenta. Actualmente el desarrollo de biosensores requiere una aproximación multidisciplinar implicando a áreas muy diversas tales como la química, la biología, la ingeniería, etc. [92].

### 2.2.1. Consideraciones generales de los biosensores. Definición y clasificación.

De acuerdo con la IUPAC, el término biosensor se reserva para definir un dispositivo analítico que incorpora un elemento de reconocimiento de origen biológico o biomimético, íntimamente asociado con un transductor fisicoquímico que, en presencia de un analito, produce una señal eléctrica discreta o de carácter continuo, proporcional a la cantidad presente del mismo [93].

Atendiendo a su estructura, un biosensor consta de dos componentes principales [94,95]: el **elemento biológico de reconocimiento**, cuya función es la de transformar la información química en una forma de energía, y el **transductor**, que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito (Figura 7).

Es importante no confundir el término "biosensor" con un dispositivo que mide moléculas biológicas, ya que en realidad el prefijo "bio" hace referencia a la parte receptora biológica que lleva incorporada en su interior, no a la naturaleza del analito monitorizado.

Los biosensores se aplican en áreas muy diversas (e.g. campo farmacéutico, control de los alimentos, control medioambiental, seguridad y defensa, campo clínico y cuidado de la salud), y en sus múltiples aplicaciones es deseable que cuenten con las siguientes características [97]:

- *Alta sensibilidad*, con límites de detección lo más bajos posibles, ya que muchos de los compuestos a cuyo análisis están destinados presentan efectos nocivos sobre la salud humana o animal a muy bajas concentraciones.
- *Alta selectividad*, generalmente limitada por el elemento de reconocimiento. Es deseable que el sensor responda únicamente al compuesto de interés, y no a otros componentes de la muestra a analizar, por lo que deberá ser capaz de discriminar compuestos de estructuras químicas muy similares.
- Fabricación a gran escala, con un *bajo coste*.
- *Tiempo de vida largo*, tanto durante su aplicación como en los periodos de almacenamiento.

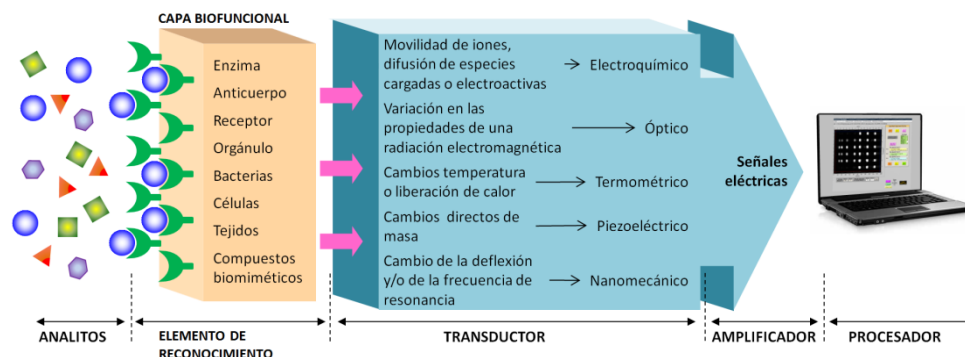


Figura 7. Componentes y mecanismo de funcionamiento de un biosensor [92,96].

- *Reutilizables*, es decir, que permitan realizar determinaciones consecutivas en más de una muestra.
- *Tiempo de análisis corto* o incluso análisis en tiempo real, a ser posible sin etapa de pretratamiento de la muestra.
- *Manejo sencillo*, de forma que no requiera personal cualificado.
- *Portátiles*, para que puedan emplearse en análisis de campo.
- *Automatizables y miniaturizables*, facilitando su integración en sistemas en línea.
- Pocos requerimientos operativos, que reduzcan el coste de mantenimiento.
- Con *capacidad multi-análisis y/o multi-muestra*, es decir, que permitan el análisis simultáneo de diferentes analitos y/o muestras.

Los biosensores pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios, como el modo en que interactúan el elemento de reconocimiento y el analito, la metodología de detección empleada para concretar dicha interacción y la naturaleza del elemento de reconocimiento o del sistema de transducción (Tabla 9).

Tabla 9. Criterios de clasificación de los biosensores [97].

Mecanismo de interacción	Sistema de reconocimiento	Sistema de transducción
Catalítico	Enzima	Electroquímico
Afinidad	Órgano, tejido o célula	Óptico
Metodología de la detección	Receptor biológico	Piezoeléctrico
	Anticuerpo	Termométrico
Directa	Ácidos nucleicos	Magnético
Indirecta	MIP, PNA, aptámero	Nanomecánico

**Tabla 10.** Elementos de reconocimiento más comúnmente empleados en el desarrollo de biosensores [92,97].

Naturaleza	Elemento de reconocimiento	Mecanismo de interacción
BIOLÓGICO	Enzimas	CATALÍTICO
	Células, tejidos y orgánulos	
	Anticuerpos y lectinas	AFINIDAD
	Receptores y canales iónicos	
BIOMIMÉTICO	Ácidos nucleicos y PNAs	
	Aptámeros	
	MIPs *	

\*Se han descrito MIPs con mecanismo de interacción catalítico.

Para poder aplicarse en la fabricación de sensores, los elementos de reconocimiento deberán cumplir dos criterios fundamentales: 1) presentar una afinidad elevada hacia el analito objeto de reconocimiento, que permita su determinación selectiva en presencia de otros compuestos y, 2) permanecer estables a lo largo del tiempo [92]. En la Tabla 10 se recoge la clasificación de los elementos de reconocimiento más empleados en el desarrollo de biosensores. Éstos pueden ser tanto de origen natural, *i.e.* elementos **biológicos** (enzimas, orgánulos, tejidos o células completas, receptores biológicos, anticuerpos, ácidos nucleicos), como artificial, *i.e.* elementos **biomiméticos** (MIPs, del inglés *molecular imprinted polymers*; PNAs, del inglés *peptide nucleic acids*; aptámeros, etc.). La elección del elemento de reconocimiento dependerá, sobre todo, de las características del compuesto a analizar y del tipo de muestra.

El mecanismo de interacción entre el elemento de reconocimiento y la molécula reconocida (analito) puede suponer simplemente el enlace entre los mismos o bien ser de naturaleza catalítica. Atendiendo a este criterio, los biosensores se pueden clasificar en dos grupos: biocatalíticos y de bioafinidad. Los **biosensores catalíticos** se basan en la utilización de catalizadores biológicos que median en una reacción química, en la que intervienen uno o varios sustratos, para generar uno o varios productos. Pueden emplearse: a) para detectar la presencia de alguno de los sustratos que participan en la reacción, bien cuantificando la desaparición de co-sustratos o cofactores conocidos o bien por la generación de algún producto, o b) indirectamente, para detectar

compuestos que interfieren en la reacción de manera selectiva inhibiendo la actividad del biocatalizador. Por el contrario, los **sensores de bioafinidad** se basan en la interacción del analito de interés con el elemento de reconocimiento, sin que medie transformación catalítica. La interacción conlleva la modificación de un equilibrio en el que se forma un complejo analito-receptor.

Otra manera de clasificar los biosensores es atendiendo al principio de funcionamiento del **transductor**, que puede ser electroquímico, óptico, piezoeléctrico, termométrico o nanomecánico. La elección del sistema de transducción está condicionada por el tipo de elemento de reconocimiento elegido, ya que este va a determinar cuál es la variación en las propiedades físico-químicas que se produzcan en la interacción con el analito.

En función de la **configuración de uso**, encontramos sensores desechables (de un único uso), sensores de uso intermitente o sensores de uso continuo [98]. En los sensores de uso único, la muestra se pone en contacto con el sensor durante un periodo de tiempo establecido, tras el cual se realiza la medida e interpretación de los resultados. Ejemplos de sensores desechables son las tiras reactivas para medir glucosa, los tests de embarazo, etc. Aunque hoy en día los artículos de investigación publicados bajo el tema “biosensores” empleando esta configuración suponen menos del 1%, este tipo de biosensores representa más del 90% del mercado [99]. La segunda aproximación es emplear el sensor de forma intermitente. En este caso, se trabaja generalmente con una corriente constante de disolución portadora y las muestras se procesan secuencialmente. Por último, los sensores pueden trabajar en una configuración de medida continua, monitorizando la concentración de analito en función del tiempo.

Atendiendo a la forma de **detección de la interacción** entre el elemento de reconocimiento y el analito, los biosensores se pueden clasificar en biosensores de detección directa, cuando no se requieren especies auxiliares para evaluar la extensión de la interacción, o de detección indirecta, cuando se utiliza un sistema de marcaje capaz de proporcionar una señal relacionada con la concentración de analito.

En función de su **aplicación**, se pueden dividir en dos grandes grupos: biosensores selectivos, diseñados para el análisis de un analito, familia o grupo de analitos concreto, o biosensores genéricos, diseñados para la evaluación de un efecto biológico o la determinación de un parámetro global [100].

Por último, según la **disposición espacial entre la superficie activa y el analito** objeto de estudio, se distingue entre biosensores **hidrostáticos**, donde el elemento bioactivo es móvil, poniéndose en contacto con la disolución a medir por simple inmersión en la muestra problema, la cual permanece estática; o **hidrodinámicos** cuando la superficie

bioactiva es fija y un sistema de distribución de fluidos permite transportar la muestra problema hasta dicha superficie [101].

La cantidad y tipos de biosensores que actualmente están en uso o en periodo de investigación es muy amplia: desde sensores de hidrógeno hasta sensores de ADN, pasando por dispositivos detectores de colesterol en sangre o de virus tales como el SIDA. Uno de los más conocidos es el utilizado por los diabéticos para medir la concentración de glucosa en sangre, basado en el anclaje sobre un electrodo de una enzima que, al entrar en contacto con la sangre, se activa, originándose una reacción química que lleva asociado un movimiento de electrones. El electrodo es capaz de registrar dicho cambio y traducirlo en la información que aparecerá en la pantalla del medidor de forma casi inmediata.

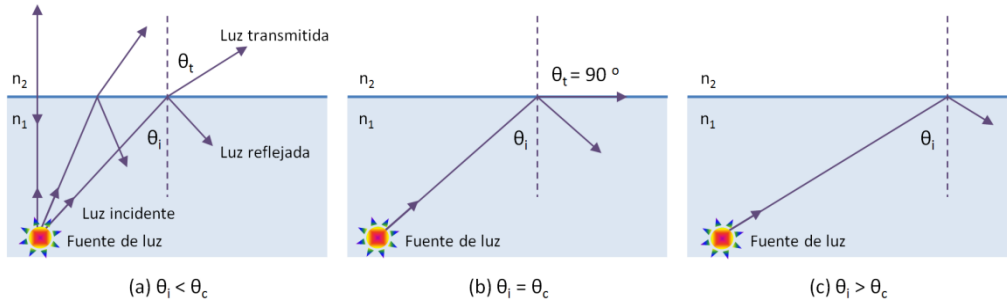
Los biosensores también se emplean en el análisis de alimentos susceptibles de contener sustancias nocivas tales como la bacteria de la salmonella, en detección rápida de agentes contaminantes en caso de guerra química y bacteriológica, etc. El uso de biosensores puede extenderse a una infinidad de campos ya que, si se dispone del receptor biológico adecuado, esta tecnología es susceptible de detectar prácticamente cualquier sustancia [102].

### 2.2.2. Biosensores ópticos.

Hoy en día, los biosensores con transducción óptica son, junto a los transductores electroquímicos, los más utilizados en el desarrollo de sensores.

Los transductores ópticos se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de una radiación electromagnética, como consecuencia de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento. Los biosensores ópticos utilizan tanto métodos de detección directa como métodos de detección indirecta, adaptándose igualmente a sistemas biocatalíticos o de bioafinidad. El desarrollo de estos dispositivos se incrementó de forma notable con la introducción de la fibra óptica y las guías de onda plana.

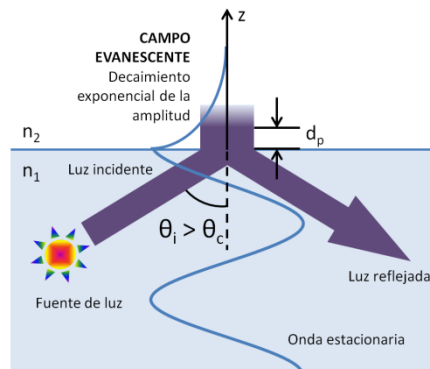
Los **optrodos** son sensores contruidos empleando fibras ópticas, de manera que en uno de sus extremos se inmoviliza el elemento de reconocimiento y en el otro, tanto el sistema de excitación como el sistema de detección. Generalmente, estos sensores requieren marcadores (e.g. colorantes, moléculas fluorescentes o moléculas bio- o quimioluminiscentes), sensibles a los cambios producidos por la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento, de forma que el cambio en la intensidad de absorción o emisión del marcador se propaga a través de la fibra óptica hacia el sistema



**Figura 8.** Fenómeno de reflexión interna total (TIR). (a) En la interfase de dos medios de diferente índice de refracción, la luz incidente que viaja desde el medio de mayor índice de refracción al de menor índice, es parcialmente refractada y parcialmente reflejada. El rayo de luz transmitida se desvía de la normal, de tal manera que el ángulo de salida es mayor que el ángulo incidente (reflexión interna). (b) El ángulo de salida alcanzará los  $90^\circ$ , para un ángulo de incidencia denominado ángulo crítico,  $\theta_c$ . (c) Cuando el ángulo de incidencia es superior al  $\theta_c$ , toda la luz es reflejada, fenómeno denominado TIR.

de detección (fotodiodo o fotomultiplicador). La propagación de la radiación en la fibra tiene lugar mediante el fenómeno de reflexión interna total (TIR, del inglés *total internal reflection*) (ver Figura 8).

Cuando el haz de luz se transmite en condiciones de TIR en el interior de una guía de onda, el campo electromagnético asociado a esta radiación no queda completamente confinado en el interior del núcleo de la misma, sino que se extiende a las zonas limítrofes, decayendo exponencialmente con la distancia y originando lo que se denomina un “**campo evanescente**” (Figura 9).



**Figura 9.** Generación de una onda evanescente en condiciones de TIR.

El campo evanescente, generado en la interfase de los dos medios, va a interactuar con las especies presentes en dicha interfase, de forma que cualquier interacción molecular (analito-receptor) que tenga lugar dentro de este campo evanescente, producirá cambios en las características de la luz propagada por la guía de onda [92]. Este es el principio de funcionamiento de los transductores ópticos basados en medidas de onda evanescente, y los biosensores que emplean este principio de transducción se denominan **biosensores de onda evanescente**. Este es el caso de los sensores de reflectancia total atenuada, que miden cambios en las regiones del infrarojo, visible y ultravioleta; los sensores de resonancia de plasmón superficial (SPR, del inglés *surface plasmon resonance*) y técnicas interferométricas, basadas en la medida de variaciones del índice de refracción ( $n$ ); y los sensores de reflexión interna total de fluorescencia (TIRF, del inglés *total internal reflection fluorescence*) [103].

En general, los biosensores ópticos presentan una alta selectividad y especificidad. Además, permiten el aislamiento de interferencias electromagnéticas, y una medida rápida o incluso en tiempo real. Estos dispositivos pueden adaptarse para la detección multicanal y/o multiparámetro, así como miniaturizarse, permitiendo su integración en sistemas más complejos y, en función de los componentes ópticos elegidos, pueden resultar bio-compatibles para su uso en el cuerpo humano [104].

Los sensores de fibra (optrodos) son robustos desde el punto de vista medioambiental, pudiendo emplearse en condiciones adversas (*e.g.* altas temperaturas, vibraciones o sismos, etc), y permiten realizar análisis remotos, ya que la luz transmitida a lo largo de la fibra es bidireccional, haciendo posible la monitorización de distintos parámetros en lugares físicamente poco accesibles.

### 2.2.3. Biosensores ópticos de onda evanescente basados en el empleo de una guía de onda plana.

Una de las configuraciones más empleadas en el desarrollo de biosensores se basa en el empleo de guías de onda planas. En función de las dimensiones de la guía, estos dispositivos pueden clasificarse en sensores de óptica integrada, cuando las dimensiones de la guía son comparables a la longitud de onda; o sensores de reflexión total interna si las dimensiones son mucho mayores a la longitud de onda. En este caso, la propagación de la luz a través de la guía puede describirse mediante óptica de rayos.

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, el fenómeno de onda evanescente se produce en la interfase óptica de dos medios con diferente índice de refracción (Figura 9). La radiación transmitida por la guía de onda (medio de mayor  $n$ ) penetra dentro del medio de menor índice. La profundidad de penetración ( $d_p$ )

depende de la longitud de onda de la radiación transmitida y de los índices de refracción de los dos medios. Valores típicos para el valor de  $d_p$  oscilan entre 100 y 300 nm [103]. Este valor es mayor que el espesor de una capa de proteínas inmovilizada sobre la guía de onda, como por ejemplo un anticuerpo.

Si se inmovilizan elementos de reconocimiento sobre la superficie de la guía de onda plana, estos interactuarán con la onda evanescente generada. Cualquier cambio que se produzca en el campo evanescente debido a esta interacción influirá en las características de la luz que se propaga por el interior de la guía, y podrá ser, por tanto, monitorizada. Por ejemplo, la radiación que penetra en esta fase podrá ser absorbida por el material inmovilizado o podrá inducir su fluorescencia, si se trata de compuestos luminiscentes [105].

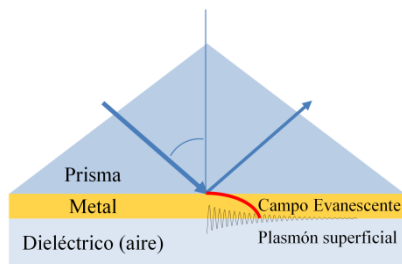
Además, el empleo de guías de onda planas ofrece la posibilidad de realizar análisis de múltiples muestras y/o moléculas de forma simultánea, por medio de la inmovilización de los elementos de reconocimiento de acuerdo a un patrón ordenado en las dos dimensiones de la guía.

### 2.2.3.1. Biosensores ópticos basados en SPR.

Un tipo concreto de sensores ópticos son los sensores de resonancia de plasmón superficial (SPR). Esta técnica es una extensión del sensado por onda evanescente, con la diferencia de que la guía de onda plana se reemplaza, en este caso, por una interfaz metal-dieléctrico.

Como se ha visto en apartados anteriores, en condiciones de TIR la luz no se refleja totalmente, sino que parte del campo electromagnético asociado a la radiación se extiende a zonas limítrofes, propagándose de manera paralela a la superficie de unión entre ambos medios (onda evanescente). Si se coloca una lámina metálica sobre uno de los medios, el campo evanescente creado excita los electrones libres del metal, haciendo que entren en resonancia. Estas oscilaciones colectivas de los electrones de conducción del metal se conocen como plasmones y su resonancia va a depender del índice de refracción ( $n$ ) del medio adyacente. La variación de la composición del entorno produce un cambio en  $n$  y, por tanto, en la resonancia de los plasmones. Así pues, mediante esta técnica es posible medir, de forma directa, procesos de unión, tales como interacciones antígeno-anticuerpo o ligando-receptor, hibridaciones de DNA, etc., ya que, por efecto de la unión, se producirán pequeños cambios en el valor de  $n$ . Hoy en día existen diversos dispositivos comerciales (e.g. BIAcore 3000, Reichert SR7000, IBIS-iSPR, etc.) basados en este principio de medida, aptos para el análisis de contaminantes, por ejemplo, en muestras medioambientales y agroalimentarias [106].

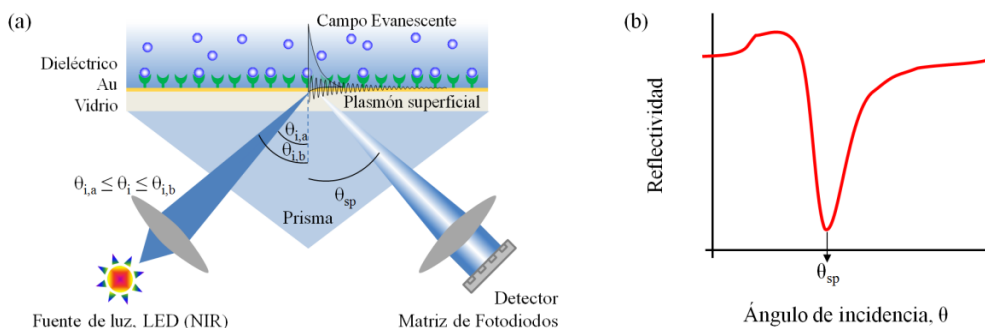




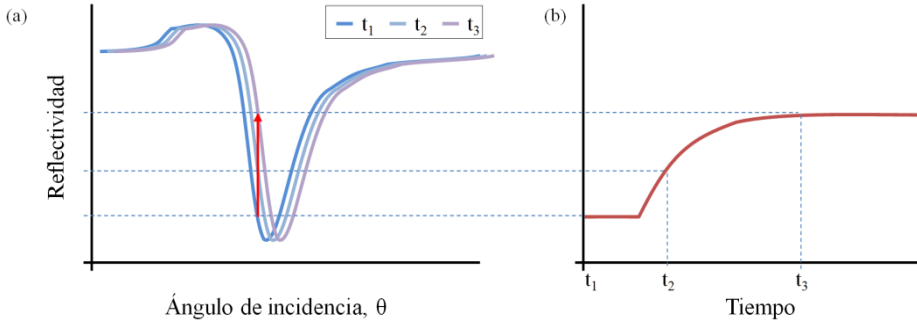
**Figura 10.** Configuración de Kretschmann–Raether para la excitación de plasmones superficiales [107].

El primer dispositivo de SPR comercial fue introducido en el mercado por BIAcore. Como la mayoría de los sensores basados en SPR, los dispositivos BIAcore presentan la denominada configuración de Kretschmann (Figura 10).

Los equipos tradicionales de SPR (de configuración análoga al BIAcore) se basan en mediciones angulares, empleando luz monocromática para la excitación de los plasmones. La medida se realiza inmovilizando el elemento de reconocimiento sobre un chip (fina capa de oro depositada sobre un sustrato de vidrio), el cual se dispone contra el prisma del sistema óptico del equipo, por el lado del vidrio. La luz procedente de un diodo emisor de luz (LED, del inglés *light-emitting diode*) infrarrojo, polarizada, se enfoca a través del prisma sobre la superficie del chip, de manera que el haz incidente se dispersa en forma de abanico, dando un intervalo de ángulos de incidencia (Figura 11.a). La luz reflejada desde el chip es recogida por el detector (i.e. matriz de fotodiodos), el cual cubre un intervalo de ángulos de refracción apropiado. La



**Figura 11.** (a) Esquema del sistema óptico en un dispositivo BIAcore. El haz reflejado se muestra con una escala de color, donde el azul corresponde a intensidad de luz reflejada alta, mientras que el blanco representa baja intensidad. (b) Perfil típico de la curva de reflectividad para una película de oro.



**Figura 12.** Modos de operación de dispositivo BIAcore. (a) Modo de barrido; (b) Modo cinético.

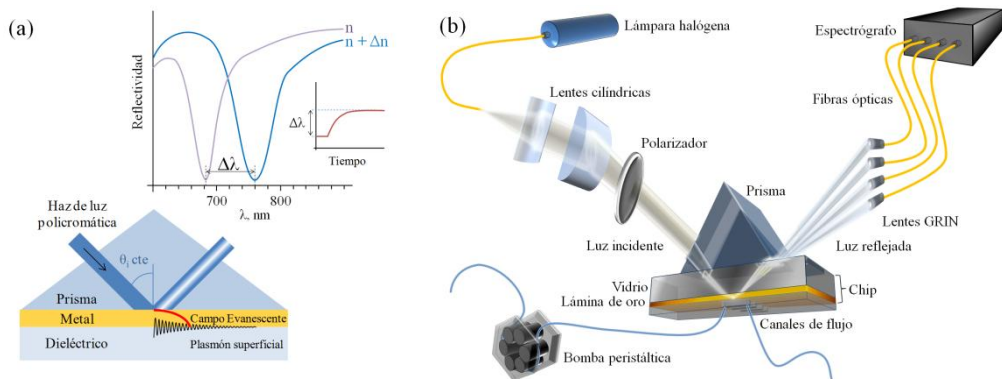
excitación de los plasmones se produce sólo a un determinado ángulo de incidencia ( $\theta_{sp}$ ), registrándose la correspondiente pérdida de potencia del haz reflejado a dicho  $\theta$  (Figura 11.b). El  $\theta_{sp}$  depende de los índices de refracción de los medios adyacentes a la lámina metálica, por lo que las variaciones que se produzcan en el índice de refracción de los mismos serán registradas como desplazamientos en el valor de  $\theta_{sp}$  y relacionadas con variaciones producidas en la superficie sensora.

Este tipo de dispositivos permite medir la variación en  $\theta_{sp}$  en tiempo real, sin movimiento físico de los componentes ópticos (i.e. fuente de luz, chip/prisma o detector).

Los cambios superficiales en la interfase pueden monitorizarse de dos formas distintas (Figura 12):

- *Modo de barrido*, midiendo la reflectividad en función del ángulo de incidencia, lo que permite obtener la posición angular del mínimo de reflectividad,  $\theta_{sp}$ .
- *Modo cinético*, fijando un ángulo de incidencia determinado y registrando la variación de la reflectividad en función del tiempo para dicho ángulo. El ángulo se elige preferentemente a la derecha del  $\theta_{sp}$ , ya que en esa zona las pendientes de las curvas de reflectividad a medida que se deposita masa sobre la superficie del sensor son prácticamente paralelas y, como consecuencia, el aumento en la reflectividad es proporcional al  $\Delta\theta_{sp}$ , que a su vez es proporcional al espesor o masa adsorbida.

El sensor SPR descrito en el presente trabajo de tesis se ha puesto a punto empleando un equipo desarrollado por el grupo de investigación dirigido por J. Homola, en el Instituto de Fotónica y Electrónica (Praga, República Checa) [108,109]. El principio de medida de este equipo, al igual que en el caso de los dispositivos BIAcore, se basa en la geometría Kretschmann, empleando el método de reflexión total atenuada. Sin embargo, a diferencia de los equipos tradicionales de SPR basados en modulación



**Figura 13.** (a) Sensor SPR de modulación espectral. (b) Esquema del sensor SPR de cuatro canales empleado en el desarrollo del presente trabajo de tesis doctoral [109].

angular, este dispositivo se basa en modulación espectral o de longitud de onda ( $\lambda$ ). En este caso, la luz empleada no es monocromática, sino policromática. La radiación de banda ancha procedente de una lámpara halógena es colimada y reflejada desde la base del prisma al cual está unido el chip SPR (Figura 13.a). Tras incidir en el chip, se produce la excitación de los plasmones superficiales, recogién dose la luz reflejada desde cuatro áreas de la capa de oro del chip (canales sensores), a través de lentes GRIN (del inglés *gradient refraction index*), en cuatro fibras ópticas conectadas a un espectrógrafo de cuatro canales (ver Figura 13.b). El chip se conecta a una célula de flujo de cuatro canales, alineados con cada una de las cuatro áreas sensoras, a través de la cual se hacen fluir las muestras empleando una bomba peristáltica multicanal. La señal adquirida se analiza en tiempo real empleando un software que permite la determinación de la longitud de onda de resonancia en cada canal de detección.

En los dispositivos basados en modulación angular (e.g. BIAcore) el detector debe alojarse en una posición concreta, próximo al prisma, lo que limita su potencial para la miniaturización. Sin embargo, los dispositivos basados en modulación espectral no presentan esta limitación, por lo que su potencial para la miniaturización es mayor. Además, al emplear fibras ópticas para recolectar y transmitir el haz de luz reflejada desde el prisma al detector, se posibilita su aplicación al análisis en localizaciones remotas [110].

Una de las principales ventajas de los sensores de SPR es que no requieren marcadores moleculares (e.g. fluorescentes, radiactivos, etc.), ya que la unión entre moléculas puede observarse directamente. Además, son sistemas muy versátiles, y permiten el análisis en tiempo real. Sin embargo, debido a que son sensibles a cualquier

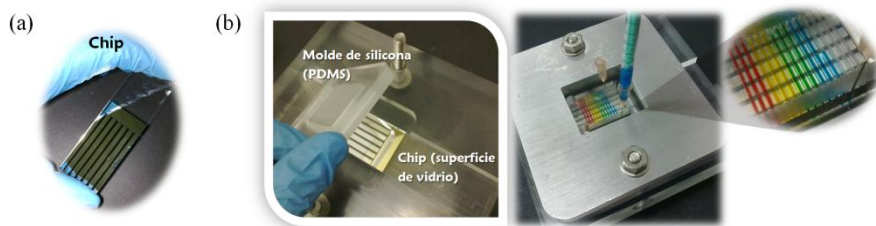
efecto que produzca una variación del índice de refracción, su respuesta puede verse afectada por fluctuaciones de la temperatura o por la distinta composición de la muestra (efecto matriz).

#### **2.2.3.2. Biosensores ópticos basados en fluorescencia. Matrices de biosensores.**

Dentro de los sensores ópticos de onda evanescente, se encuentran los sensores de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF), basados en el empleo de marcadores moleculares fluorescentes. En este caso, la radiación del campo evanescente será absorbida por la sonda, inmovilizada en la superficie de la guía de onda, induciendo su fluorescencia. La intensidad de emisión generada puede medirse y relacionarse con la concentración de analito presente en la muestra.

La necesidad de utilizar biorreactivos marcados incrementa el número de etapas requeridas para el análisis empleando este tipo de sensores, con respecto a técnicas de detección directa, como la espectroscopía por SPR. Además, la presencia de la sonda puede modificar la afinidad del biorreactivo o interferir con la reacción de biorreconocimiento [103]. La elección de dicha sonda y el modo de unión de la misma al biorreactivo son, por tanto, factores a tener en cuenta en el desarrollo de estos dispositivos. Sin embargo, las técnicas TIRF proporcionan mejores resultados que las técnicas de detección directa cuando la medida de los analitos se realiza en muestras reales en lugar de medios tamponados (e.g. plasma, aguas residuales, etc.) ya que, en general, su respuesta se ve menos afectada por los componentes presentes en la muestra (menor efecto matriz). Al emplearse la radiación del campo evanescente como medio de excitación, sólo se van a excitar las moléculas próximas a la superficie, lo que reduce el efecto matriz y aumenta la sensibilidad de la medida. Además, las sondas fluorescentes presentan ciertas ventajas con respecto a otro tipo de marcadores: su estabilidad suele ser mayor que la de las enzimas, que adicionalmente requieren el empleo de sustratos, incrementando el coste del ensayo y el tiempo de análisis; y suelen presentar mayor tiempo de vida y estabilidad que las sondas radioactivas, siendo su uso más seguro.

A pesar de los avances tecnológicos de las últimas décadas, el desarrollo de matrices de biosensores sigue siendo difícil y en muchas ocasiones su uso queda limitado al trabajo de investigación. Si bien el empleo de guías de onda planas permite realizar análisis multianalito y/o multimuestra, para ello se requiere inmovilizar distintas biomoléculas en una única superficie, de una forma ordenada y mediante procedimientos reproducibles. En consecuencia, la funcionalización de la guía de onda es una etapa crítica que a menudo implica múltiples pasos y está sujeta a un alto grado de variabilidad. Dada a la dificultad de esta etapa, es habitual que su desarrollo se lleve



**Figura 14.** (a) Guía de onda plana. (b) Funcionalización de la guía de onda empleando un patrón ordenado en dos dimensiones, mediante el uso de micromoldes de PDMS.

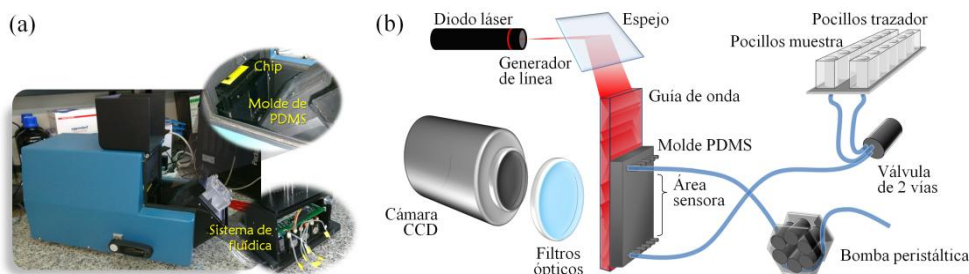
a cabo empleando equipos caros, con complejas condiciones de operación, no disponibles en muchos laboratorios. Por otra parte, la medida y el análisis de datos se realizan mediante programas informáticos de procesamiento de imagen complejos.

Por tanto, es necesario el desarrollo de dispositivos compactos, baratos y fáciles de usar, que permitan la transferencia de las matrices de sensores del laboratorio de investigación al laboratorio de análisis o que puedan emplearse para el análisis *in situ*.

En la presente Tesis, se ha llevado a cabo el desarrollo de matrices de biosensores ópticos empleado vidrios portaobjetos de microscopio como guías de onda (chip). Estas guías de onda presentan una superficie capaz de acomodar múltiples regiones sensibles (matriz 15 x 6) del orden de 3 mm<sup>2</sup> (Figura 14.a).

La funcionalización del chip se lleva a cabo inmovilizando los elementos de reconocimiento o biorreactivos deseados, en zonas concretas de la guía de onda, empleando moldes de poli(dimetilsiloxano) (PDMS, del inglés *poly(dimethylsiloxane)*), los cuales son baratos de producir y reutilizables para la funcionalización de múltiples chips. El molde se dispone sobre la superficie de la guía de onda, formando 15 canales paralelos entre sí (Figura 14.b). Cada canal se rellena con una disolución, utilizando para ello agujas hipodérmicas y jeringuillas desechables. Estas disoluciones contienen los biorreactivos a inmovilizar, que pueden ser distintos en cada caso. Por tanto, la funcionalización de la guía de onda se realiza empleando material de bajo coste, al alcance de cualquier laboratorio de análisis.

Tras la funcionalización del chip, la detección se lleva a cabo empleando una unidad portátil Leopard Array Biosensor™ HLAB-2002 (Hanson Technologies Inc., EEUU) (Figura 15) [111]. Este equipo es una versión comercial del prototipo desarrollado por el grupo de la Dra. F. Ligler, en el Laboratorio de Investigación Naval (NRL, del inglés *Naval Research Laboratory*, EEUU).



**Figura 15.** (a) Unidad portátil Leopard Array Biosensor™ HLAB-2002, Hanson Technologies, Inc., EEUU, empleada en la presente tesis doctoral. (b) Esquema de la unidad portátil.

El equipo está provisto de un diodo láser de 635 nm que actúa como fuente de excitación, equipado con un generador de línea que despliega el haz puntual del láser en un haz lineal, de una cámara CCD como detector y de un sistema de microfluídica para el análisis automático de 6 muestras de forma simultánea. Además, presenta 2 módulos de 6 depósitos o pocillos cada uno, para depositar las disoluciones de muestra y trazador (biorreactivo marcado con la sonda fluorescente).

El chip funcionalizado se coloca verticalmente en el equipo y se presiona contra un molde de PDMS de 6 canales, formando los 6 canales de ensayo, paralelos entre sí y perpendiculares a las zonas previamente funcionalizadas de la guía de onda. Cada canal está conectado a una bomba peristáltica y a una válvula de 2 vías que permite alternar el flujo entre la disolución de la muestra y la del trazador. Durante el ensayo, se produce la reacción de biorreconocimiento únicamente en las zonas coincidentes entre los canales de funcionalización y los canales de ensayo, obteniéndose 90 zonas sensoras, 15 por cada muestra.

Tras el ensayo, la radiación procedente del diodo láser se enfoca, empleando un espejo, sobre el extremo del vidrio empleado como guía de onda, iluminando de forma homogénea la zona sensible en la que se ha producido la reacción de biorreconocimiento. La radiación se transmite por TIR originando un campo evanescente, que excita las moléculas fluorescentes que se encuentran en la zona sensible. La radiación de fluorescencia emitida se filtra empleando un filtro long-pass (665 nm) y un filtro band-pass ( $700 \pm 35$  nm), para eliminar la luz dispersada, y se mide con la cámara CCD, que permite obtener una imagen de la superficie de la guía de onda.

La imagen adquirida se analiza empleando un software de fácil manejo, propiedad de la casa comercial, que también controla el sistema de fluídica durante el ensayo. La

posición y la intensidad de las zonas fluorescentes permiten identificar y cuantificar la concentración de contaminante en cada una de las muestras analizadas [112].

#### 2.2.4. Inmunosensores.

Un caso particular de biosensor lo constituyen los inmunosensores, basados en el empleo de anticuerpos (Abs, del inglés *antibodies*) como elementos de reconocimiento.

Los Abs son glicoproteínas pertenecientes al grupo de las  $\gamma$ -globulinas, de ahí el nombre de inmunoglobulinas (Igs). Producidas por los linfocitos B del sistema inmunitario de los vertebrados en respuesta a un cuerpo extraño (antígeno, Ag), los Abs presentan una función biológica doble, ya que además de reconocer específica y selectivamente al Ag, se unen fuertemente a él, neutralizando su actividad. Los inmunosensores utilizan esta interacción Ag–Ab para medir, de un modo rápido, selectivo y automático, la concentración problema a niveles muy bajos [113].

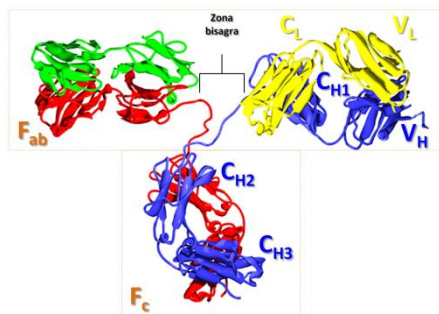
Los Abs están formados por una o varias unidades estructurales básicas (monómeros), cada una de las cuales está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas iguales dos a dos: dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L) (Figura 16). Las uniones entre estas subunidades protéicas se establecen por puentes disulfuro. En la región constante, las cadenas pesadas presentan una cadena glucídica como grupo prostético.

Tanto en las cadenas ligeras como en las cadenas pesadas, pueden diferenciarse dos regiones:

- La *región constante* (C) en el extremo carboxilo, diferente en función de la clase de Ig, presenta una función estructural, sirviendo de anclaje a los receptores de determinadas células.
- La *región variable o dominio de unión* ( $V_L$  y  $V_H$ ) en el extremo amino terminal de la molécula, diferente en cada tipo de Ab, encargada de reconocer al Ag y de unirse a él. Estos sitios de reconocimiento específicos y activos del Ab (parátomos) interaccionan con la región del Ag capaz de unirse al Ab (epítipo).

Además, los Abs tienen una zona bisagra. Esta zona es de gran importancia pues gracias a ella se pueden adaptar y unir mejor al Ag.

Las Igs presentan una masa molecular que oscila entre 150–900 kDa, con un contenido en hidratos de carbono del 2 al 15%, y un punto isoelectrico comprendido entre 4.4 y 9.5. En función de su estructura (i.e. tipo de cadena pesada:  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ; composición de aminoácidos; carga y tamaño), actividad funcional, etapa de la reacción en la que aparecen y lugar donde se encuentran (e.g. sangre, leche, saliva, etc.) las Igs se



**Figura 16.** Estructura básica de un anticuerpo. Las cadenas pesadas (rojo y azul) están unidas covalentemente entre sí por puentes disulfuro. A su vez, cada cadena ligera (amarillo y verde) está unida del mismo modo a una cadena pesada.

dividen en 5 clases o isotipos: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, siendo las IgGs las que se encuentran en mayor proporción (80% del total) y las más utilizadas en el análisis inmunoquímico. En la Tabla 11 se recogen las principales características de las Igs.

Un Ab interactúa, en la mayoría de los casos, específica y reversiblemente con el Ag que indujo su producción. Esta interacción obedece la ley de acción de masas e incluye fuerzas electrostáticas (entre grupos funcionales cargados), puentes de hidrógeno (entre grupos funcionales polares) e interacciones hidrofóbicas (entre grupos funcionales apolares) y de Van der Waals. Estas interacciones se pueden ver afectadas por cambios de pH, temperatura, fuerza iónica del medio, presencia de polímeros lineales, etc., factores que pueden utilizarse para aumentar la especificidad de las interacciones Ag-Ab, disminuyendo las interacciones no deseadas o inespecíficas [114].

**Tabla 11.** Clasificación y características de las inmunoglobulinas.

Inmunoglobulina	Características
IgM	Pentámeros. Peso molecular ~ 970 kDa Alto contenido en carbohidratos (10-12%) Primeros Abs en producirse No tienen regiones bisagra (no se adaptan bien) Aparecen como antenas en los linfocitos B
IgG	Monómero Se generan después de las IgM Pueden atravesar la placenta y proteger al feto Indican que la infección es un proceso antiguo

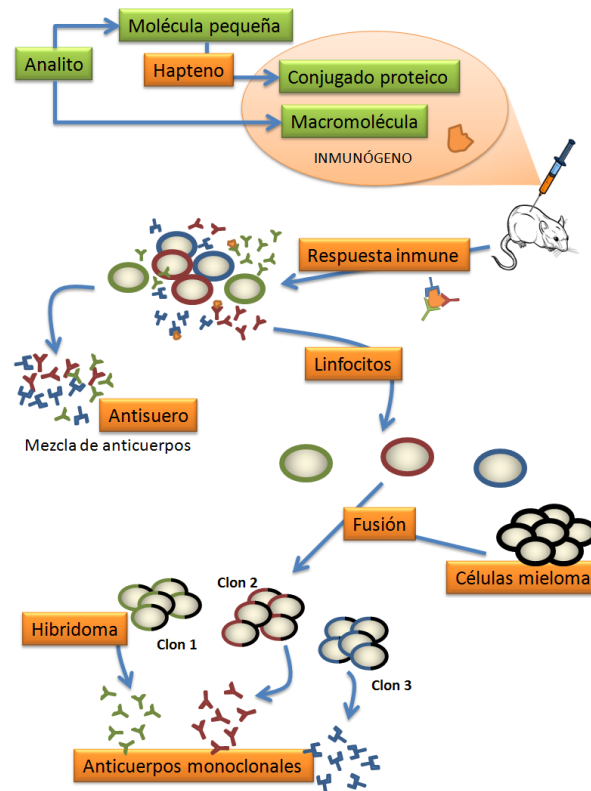


Tabla 11. Continuación.

Inmunoglobulina	Características
IgA	Monómeros, dímeros o polímeros Aparecen después de las IgM Presentes en la saliva, leche (los más abundantes en las secreciones) y las mucosas de los tractos intestinal y digestivo
IgD	Sustituyen a las IgM y tienen más afinidad que estas Aparecen como antenas de los linfocitos B
IgE	Peso molecular ~ 188 kDa Elevado contenido en carbohidratos (~ 12%) De alta afinidad Median en los procesos alérgicos Su función es la de eliminar parásitos, en particular gusanos

La obtención de Abs que reconozcan específicamente a un Ag se realiza inmunizando un animal con dicha sustancia lo que provoca la respuesta inmune, de forma que los linfocitos B del animal producen IgGs selectivas al analito inyectado (Figura 17). No obstante, cuando el analito es una molécula pequeña ( $MW < 5$  kDa), no es capaz de generar la respuesta inmune, por lo que se une covalentemente a una macromolécula, generalmente proteínas inertes, ajena al organismo a inmunizar, como KLH (del inglés *keyhole limpets hemocyanin*), BSA (del inglés *bovine serum albumin*) u OVA (del inglés *ovalbumin*), inyectando posteriormente al animal el conjugado resultante. Para generar estos conjugados (inmunógenos), se requiere, en muchos casos, la síntesis previa de moléculas derivadas del analito (hapteno), que contengan un grupo funcional apropiado para su unión a la proteína transportadora. Estos haptenos tienen que ser lo más similares posible al analito en estructura y geometría, distribución electrónica y capacidad de establecer puentes de hidrógeno, así como en sus propiedades hidrofóbicas [115].

La estimulación de distintas células de linfocitos B produce una respuesta denominada policlonal, ya que el conjunto de linfocitos va a secretar una mezcla heterogénea de anticuerpos con diferente afinidad y especificidad hacia el inmunógeno (antisuero policlonal, PABs). Los PABs son fáciles de obtener y en general presentan una sensibilidad elevada. Sin embargo, la cantidad de Abs depende de la talla del animal inmunizado y sus propiedades varían entre distintos animales, por lo que su producción es irreproducible. Una alternativa son los Abs monoclonales (MABs),



**Figura 17.** Proceso seguido para la obtención de Abs monoclonales.

obtenidos aplicando la tecnología de hibridomas. En este caso, tras la inmunización del animal, los linfocitos B se fusionan con células tumorales (mielomas) dando lugar a líneas celulares inmortales, conocidas como hibridomas. Estos hibridomas pueden someterse a procesos de cribado, selección y clonación, hasta identificar un único clon productor de un Ab con las propiedades deseadas (MAb). Los MAbs pueden producirse de manera ilimitada, ya que cada hibridomas se puede expandir en un medio de cultivo, convirtiéndose en una fuente inagotable de anticuerpo. Sin embargo, su producción requiere de un equipamiento y material especial, así como personal altamente cualificado, por lo que es mucho más costosa que la producción de PABs.

De desarrollo más reciente es el empleo de Abs recombinantes (RABs) [116,117], con la finalidad de incrementar la selectividad y disminuir las interacciones no específicas. Los RABs son proteínas de bajo peso molecular con propiedades similares a los anticuerpos, producidas con la tecnología del DNA recombinante. Mediante esta tecnología se extrae el DNA de los linfocitos B de un organismo inmunizado, identificando y

separando la secuencia que codifica el Ab o fragmento de Ab de interés. Esta secuencia se aislará y, mediante el uso de vectores, se introducirá en el DNA de un organismo diferente (organismo huésped), en el que posteriormente se expresará. Los organismos huésped empleados para la producción de RAbs son generalmente bacterias (e.g. *E. coli*) ya que estas ofrecen un recurso genético estable y son fáciles de manipular. Los RAbs empleados con mayor frecuencia son los fragmentos variables de cadena sencilla (scF<sub>v</sub>) o su variante con puente disulfuro (dsF<sub>v</sub>), y los fragmentos F<sub>ab</sub>, formados por un dominio variable y un dominio constante de cada cadena. Se han usado RAbs, por ejemplo, para el desarrollo de inmunoensayos tanto para la determinación de TRZs [118] como de FQs [119-121].

#### 2.2.4.1. Clasificación de los inmunosensores.

Análogamente a los biosensores, existen varias clasificaciones de inmunosensores. Por ejemplo, en función de la forma de detección, los inmunosensores se clasifican en directos o indirectos y atendiendo al sistema transductor, se distingue entre inmunosensores ópticos (e.g. absorbancia, luminiscencia, SPR, reflectancia, interferometría diferencial), electroquímicos (e.g. amperométricos, potenciométricos, voltamperométricos, conductimétricos, capacitivos), másicos (e.g. oscilador piezoeléctrico, onda acústica superficial), magnéticos, termoelectrónicos, radiactivos, etc.

Dado que los inmunosensores utilizan la interacción Ag-Ab, este apartado se va a centrar en los tipos de inmunoensayo existentes y su clasificación.

El concepto de inmunoensayo es muy amplio y dado que el número de posibles configuraciones que puede adoptar un inmunoanálisis es enorme, su clasificación y terminología puede llegar a ser confusa.

Basándose en conceptos generales, los inmunoensayos pueden clasificarse:

- Según el desarrollo de la *interacción* Ag-Ab, en homogéneos, cuando la reacción inmunoquímica se produce en el seno de la disolución sin que haya separación física entre el analito y el resto de componentes de la matriz, o heterogéneos si la interacción tiene lugar en la interfase entre un soporte sólido y la disolución, permitiendo la separación del analito del resto de la matriz.
- En función del *diseño*, los inmunoensayos pueden dividirse en competitivos (de inhibición o de reactivo limitado), cuando el analito y un homólogo marcado rivalizan por los sitios específicos del Ab (reactivo limitante), o no competitivos (o de reactivo en exceso) basados en la medida de los sitios ocupados al emplear un exceso de Ab.

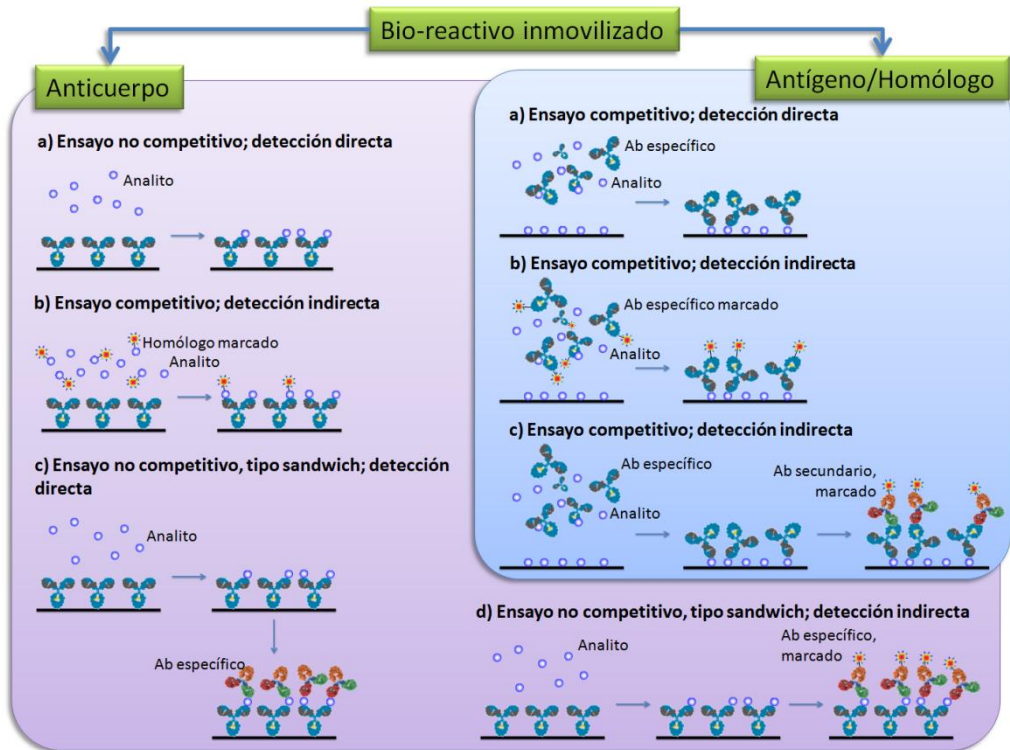


Figura 18. Esquema de los principales formatos de inmunoensayo heterogéneo.

- Según el *desarrollo del formato heterogéneo*, los inmunoensayos pueden llevarse a cabo inmovilizando el Ab, o bien inmovilizando el Ag (el hapteno o un conjugado del mismo), añadiendo en este caso el Ab en disolución (Figura 18).
- En función de la *forma de detección*, encontraremos inmunoensayos directos (o libres de marcaje) cuando no se requieren especies auxiliares para evaluar la extensión de la reacción inmunoquímica, o inmunoensayos indirectos, cuando se utiliza un sistema de marcaje capaz de proporcionar una señal relacionada con la concentración de analito. En este caso, los inmunoensayos pueden clasificarse en función del tipo de marcaje, destacando los inmunoensayos enzimáticos (EIAs, del inglés *Enzyme Immunoassays*) si se utiliza una enzima, los radioinmunoensayos (RIAs, del inglés *Radioimmunoassays*) si las medidas son radioquímicas, y los fluoroinmunoensayos (FIAs, del inglés *Fluoroimmunoassays*) si el marcador es un fluoróforo o una molécula quimioluminiscente [122].

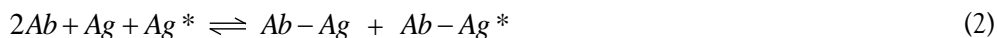
Generalmente, los inmunosensores están basados en inmunoensayos heterogéneos. Por tanto, uno de los aspectos más relevantes para el desarrollo de un inmunosensor es la preparación de la superficie activa o sensora ya que tanto el soporte utilizado como el método aplicado para la inmovilización del biorreactivo van a determinar el formato de ensayo e influirán en la sensibilidad alcanzada.

Como soporte para la inmovilización del biorreactivo suelen emplearse plásticos (e.g. PMMA, poliestireno, etc.), vidrio, silicio o materiales similares, en diferentes presentaciones (e.g. placas, láminas, membranas, partículas, tubos, etc.).

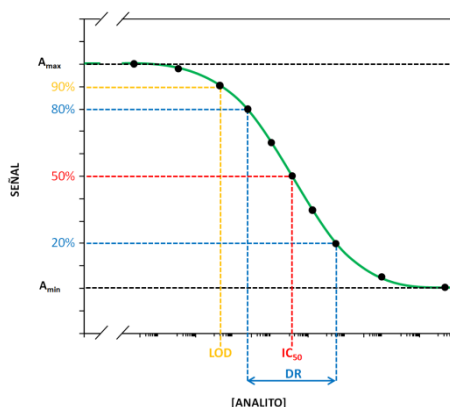
El componente inmovilizado tiene que ser incorporado en el dispositivo de forma que se garantice su actividad (si posee propiedades catalíticas) y especificidad, es decir, que el sitio de unión donde se produce la interacción se encuentre accesible. Además, es deseable que el método de inmovilización sea rápido y altamente reproducible. Las técnicas de inmovilización más empleadas en la fabricación de inmunosensores (y biosensores en general) son la adsorción física, la unión covalente, el atrapamiento en el interior de matrices poliméricas, el entrecruzamiento y el acoplamiento indirecto mediante especies biomoleculares intermedias. La elección de uno u otro procedimiento dependerá de la naturaleza del elemento a inmovilizar, el tipo de transductor, las propiedades físico-químicas del analito y las condiciones de trabajo del inmunosensor [123].

#### 2.2.4.2. Características analíticas.

En el presente trabajo de tesis se ha llevado a cabo el desarrollo de inmunosensores basados, en todos los casos, en formatos de ensayo de tipo competitivo, que pueden describirse por la siguiente reacción (2):



Un inmunoensayo se clasifica como ensayo competitivo cuando el analito (Ag) rivaliza con un homólogo (Ag\*) por los sitios específicos del Ab, que se encuentra en cantidad limitante. Así, la extensión de la unión Ab-Ag\* dependerá de la concentración de Ag libre. A mayor concentración de analito (Ag libre), menos Ag\* se une al Ab, permitiendo la cuantificación de la concentración del analito (Ag libre). Esta cuantificación se efectúa mediante interpolación de la señal en una curva patrón del analito de interés, obtenida representando la señal proporcionada por muestras patrón frente a la concentración del mismo, en escala logarítmica (Figura 19).



**Figura 19.** Curva de calibrado típica de un inmunoensayo competitivo.

La relación entre la concentración de analito (en escala logarítmica) y la señal registrada no es lineal, sino que presenta una pauta sigmoide cuyo ajuste matemático corresponde a la ecuación logística (3) [96]:

$$\text{Señal} = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + \left(\frac{[\text{analito}]}{IC_{50}}\right)^b} + A_{\min} \quad (3)$$

donde  $A_{\max}$  es la asíntota máxima y se corresponde a la señal obtenida en ausencia de analito;  $A_{\min}$ , asíntota mínima, es la señal en exceso de analito;  $b$  es la pendiente de la curva en el punto de inflexión e  $IC_{50}$  corresponde al valor de la concentración de analito en dicho punto. Ambos valores,  $IC_{50}$  y  $b$ , son indicativos de la sensibilidad y del intervalo de trabajo del método desarrollado. Por otro lado, el valor de  $IC_{50}$  ha sido relacionado con la afinidad del Ab por un analito dado. Cuanto mayor sea la afinidad del Ag por el Ab menor será el valor del  $IC_{50}$ , aunque este valor no solo depende de las características del Ab, sino que se ve afectado por el tipo de formato y condiciones de ensayo utilizadas (*i.e.* pH y fuerza iónica del medio, presencia de tensioactivos) así como de la naturaleza y concentración de las especies utilizadas en los procesos de competición, principalmente conjugados de tapizado y trazadores.

Otros parámetros analíticos de interés que se pueden definir a partir de la curva de calibrado son el límite de detección (LOD, del inglés *limit of detection*: concentración de analito que origina una disminución de la señal respecto al blanco del 10%) y el intervalo dinámico o de trabajo (DR, del inglés *dynamic range*: intervalo de concentraciones de analito que producen señales comprendidas entre el 80% y 20% del intervalo definido por las asíntotas,  $A_{\max}$  y  $A_{\min}$ ). Estos parámetros, junto con el valor de  $IC_{50}$ , se utilizan para estimar la sensibilidad del ensayo y caracterizan el método

inmunoquímico, determinando su adecuación para el análisis del analito para el que fue desarrollado. Generalmente, en este tipo de ensayos se trabaja empleando señales analíticas normalizadas, según la expresión (4):

$$\text{Señal Normalizada} = \left( \frac{B - B_{\infty}}{B_0 - B_{\infty}} \right) \quad (4)$$

donde B es la señal obtenida con una muestra de concentración arbitraria;  $B_0$ , la señal obtenida en ausencia de analito y  $B_{\infty}$  la señal correspondiente a una muestra con un gran exceso de analito (señal de fondo). De esta forma, los valores de  $IC_{50}$  y b no se modifican, y es posible comparar respuestas obtenidas en condiciones experimentales distintas.

Otra propiedad importante es la selectividad, que determina la capacidad de discriminación del Ab entre el analito de interés y posibles interferentes. Este parámetro se define a partir de la reactividad cruzada (CR, del inglés *cross-reactivity*), o relación porcentual entre los valores de  $IC_{50}$  para el analito de interés y para el interferente, calculado según la expresión (5):

$$\text{Reactividad Cruzada} = \left( \frac{IC_{50} \text{ analito}}{IC_{50} \text{ interferente}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

En general se considera que un compuesto presenta interferencia apreciable cuando el valor de CR es superior al 10%, siendo poco importante si la CR se encuentra entre el 1% y el 10%, y despreciable si es inferior al 1%.

#### 2.2.4.3. Empleo de quimeras para el desarrollo de inmunosensores.

El desarrollo de un biosensor es un proceso interdisciplinar, que abarca desde la biología, la química o la física, hasta las matemáticas, las técnicas de la información y la ingeniería. Cuando se lleva a cabo el desarrollo de un inmunosensor, independientemente de su aplicación, la integración del elemento de reconocimiento (biológico) inmovilizado sobre la superficie del transductor es la etapa clave, y va a influir de forma crítica en la funcionalidad de dicha biointerfase o superficie sensora, viéndose afectada por factores tanto químicos como físicos [124].

Como se ha indicado previamente, un inmunoensayo puede llevarse a cabo inmovilizando el Ab o el Ag (un hapteno o un conjugado del mismo). Antes de decidir el formato de ensayo a utilizar y, por tanto, el bioelemento a inmovilizar, son muchas las variables y aspectos a tener en cuenta.

Además de la selección del bioelemento, el modo elegido para su inmovilización puede influir en las prestaciones analíticas del inmunosensor (sensibilidad y/o su

especificidad) y afectar a su buen funcionamiento. Esto se debe a que el modo de inmovilización está directamente relacionado con factores tales como la estabilidad del bioelemento inmovilizado (en muchos casos el proceso de inmovilización aumenta dicha estabilidad) y su orientación [125]. La orientación del bioelemento inmovilizado va a ser crítica en la sensibilidad del inmunosensor, ya que una buena orientación facilita la interacción Ag-Ab, aumentando la actividad y la sensibilidad, pero si la orientación no es adecuada, dicho reconocimiento estará impedido, y el ensayo presentará una respuesta pobre y una sensibilidad muy baja.

A la hora de desarrollar un inmunosensor, otro factor muy importante a considerar es la posibilidad de regeneración de la superficie sensora, de modo que esta conserve su actividad y pueda emplearse en posteriores ensayos. Esta capacidad está también relacionada con el bioelemento seleccionado para realizar el ensayo y el modo de inmovilización empleado en la funcionalización.

La regeneración del sensor es posible gracias a la naturaleza no covalente de los enlaces Ag-Ab. La elección de un agente adecuado para regenerar la superficie es un factor clave, ya que este debe producir una desorción efectiva (romper la interacción Ag-Ab), manteniendo intacta la actividad del inmunorreactivo inmovilizado. Se suelen emplear a) disoluciones tamponadas, con quelatantes (*i.e.* EDTA), b) disoluciones acuosas de alta concentración salina (*i.e.* NaCl 1 M, KCl 4 M, MgCl<sub>2</sub> 2 – 4 M), ácidas (*i.e.* glicina/HCl 100 mM pH 2.5; HCl 10 – 100 mM; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM) o básicas (*i.e.* NaOH 5 – 50 mM), y c) mezclas hidro-orgánicas e incluso disolventes orgánicos [126]. La dificultad de este proceso de regeneración estará condicionada por la afinidad del Ab por el Ag. Si los Abs presentan una afinidad muy alta, la reversión de la interacción inmunoquímica será difícil, lo que forzará al empleo de mezclas de regeneración desnaturizantes, que conducirán a la pérdida de actividad y/o estabilidad del reactivo inmovilizado, y el inmunosensor resultante será de un solo uso y por lo tanto, poco práctico. Si, por el contrario, el Ab presenta una baja afinidad, el sistema será fácilmente regenerable, y por tanto, altamente reutilizable. Sin embargo, una afinidad baja conduce a sistemas de baja sensibilidad, siendo necesario establecer un compromiso entre sensibilidad y reusabilidad. En cualquier caso, la superficie sensora va a poseer una vida útil limitada, debido a la desnaturización o degradación del reactivo inmovilizado o a la pérdida de las propiedades del soporte.

La técnica de inmovilización empleada va a afectar también a otros factores tales como las interacciones inespecíficas de especies presentes en la muestra con la superficie sensora e incluso la duración del ensayo, la cual está condicionada por el formato de ensayo, y por tanto, por la especie inmovilizada.



A todo esto se suma el hecho de que la viabilidad, o eficacia de la inmovilización, va a ser dependiente de los grupos funcionales presentes, tanto en la especie a inmovilizar como en el soporte, es decir, que la eficacia del proceso va a estar condicionada tanto por la especie seleccionada para funcionalizar la superficie sensora como por el modo de inmovilización elegido.

Como se ha indicado anteriormente, las técnicas de inmovilización más empleadas son la adsorción física, el atrapamiento, el entrecruzamiento, la unión covalente o la unión mediante moléculas de afinidad (Tabla 12). La elección de uno u otro procedimiento dependerá de la naturaleza del elemento a inmovilizar, el tipo de transductor/soporte sólido, las propiedades fisicoquímicas del analito (dimensiones, composición química, dominios hidrofílicos e hidrofóbicos) y las condiciones de trabajo del inmunosensor [123].

Cuando los Ags son moléculas de bajo peso molecular, su absorción directa a la superficie del sensor conduce a superficies poco funcionales, debido a que la inmovilización es no-orientada y la accesibilidad del Ab al Ag es baja, dado el alto impedimento estérico por la proximidad del mismo a la superficie. Por ello, la inmovilización se lleva a cabo de forma indirecta, empleando conjugados del hapteno, generalmente proteicos. Estos conjugados deben estar formados por una proteína diferente a la empleada en la síntesis del inmunógeno, ya que, de lo contrario, las interacciones inespecíficas del Ab con dicha proteína podrían enmascarar la respuesta del inmunosensor.

Para inmovilizar covalentemente Ags de bajo peso molecular, suele ser necesario realizar una modificación previa de la superficie. Esta derivatización depende de la naturaleza del soporte. Así, para soportes metálicos (*i.e.* Au, Ag, Cu o Pt) se suele emplear la unión por quimisorción de tioles orgánicos, formando monocapas autoensambladas (SAM, del inglés *self-assembled monolayer*), películas orgánicas ordenadas de unos pocos a varios cientos de nm de espesor, que contienen grupos funcionales reactivos permitiendo el anclaje posterior de moléculas mediante enlace covalente [127,128]. Las SAM resultan útiles ya que, además de constituir una forma simple de funcionalizar superficies metálicas, permiten crear superficies biológicamente inertes si se emplean compuestos terminados en oligoetilenglicol (OEG) o polietilenglicol (PEG).

Los compuestos empleados típicamente para modificar superficies de óxidos metálicos (óxido de titanio, óxido de aluminio) son los silanos, los fosfatos y los fosfonatos [124]. Los silanos se emplean de forma habitual además en la modificación de materiales basados en sílice (sílice fundida, vidrio y cuarzo) debido a su facilidad de uso

y disponibilidad comercial. Estos materiales se emplean comúnmente en el desarrollo de sensores debido a su baja fluorescencia intrínseca, excelentes propiedades ópticas, y su carácter inerte frente a una gran variedad de disolventes. Sin embargo, muchos enlaces siloxano pueden hidrolizarse a alto pH y, por tanto, no siempre presentan una buena estabilidad a largo plazo.

**Tabla 12.** Procedimientos de inmovilización de biorreactivos [92].

Inmovilización	Descripción	Ventajas	Inconvenientes
Adsorción física	Unión del bio-reactivo mediante interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals	Metodología simple Bajo coste Matriz regenerable Reactivos adicionales no necesarios Sin modificaciones en el bio-reactivo	Posible pérdida del bio-reactivo por desorción Inmovilización no orientada Variabilidad entre distintas superficies
Atrapamiento/ Encapsulación	Retención física del bio-reactivo en las cavidades interiores de la matriz: sol-gel/geles (agar, nylon, almidón, poliacrilamida), matrices electródicas composites rígidas (grafito-teflón o grafito-resina epoxi)	Metodología sencilla Bajo coste Se necesita poca cantidad de bio-reactivo Sin modificaciones en el bio-reactivo Proximidad entre el biorreactivo y el transductor	Unión débil Control estricto de la polimerización de la matriz Posible dificultad de acceso al bio-reactivo por la barrera difusional impuesta
Entrecruzamiento (cross-linking)	Uniones irreversibles de los biorreactivos entre sí mediante agentes bifuncionales (glutaraldehído, polietilenimina, hezametilen-di-isocianato, 2,4-dinitro-benceno)	Coste moderado Estable en condiciones extremas Mínima pérdida de bio-reactivo	Utilización de sustancias químicas tóxicas No regenerable
Covalente	Uniones covalentes del bio-reactivo con grupos químicos activados del soporte o directamente del transductor	Fácil manipulación Baja pérdida del material biológico inmovilizado Elevada estabilidad	Posible alteración del bio-reactivo Inadecuado para biorreactivos muy sensibles (pH, temperatura). Utilización de sustancias químicas tóxicas
Afinidad	Unión del bio-reactivo mediante reacciones de afinidad, empleando moléculas tales como la avidina/biotina, proteínas A y G, lectinas.	Elevada estabilidad Fuerza de unión comparable al enlace covalente Funcionalidad biológica intacta	Necesario modificar el bio-reactivo cuando se emplea avidina/biotina

En ocasiones las superficies sensoras se recubren con poli-lisinas o matrices tridimensionales (polímeros, agarosa, o hidrogeles de acrilamida). Este es el caso, por ejemplo, de los chips CM5, habitualmente empleados en el desarrollo de sensores basados en medidas de SPR, los cuales presentan una red de dextrano carboximetilado covalentemente unido a la superficie. Estas matrices tridimensionales son muy útiles cuando se inmovilizan biorreactivos de bajo peso molecular, ya que presentan una alta capacidad de unión, así como una buena estabilidad.

Recientemente, se ha descrito la síntesis de *quimeras o conjugados proteicos de polisacáridos*. Este tipo de quimeras se ha empleado en el desarrollo de las denominadas vacunas conjugadas [129,130], una generación de vacunas en las que, polisacáridos procedentes de la cápsula de las bacterias patógenas, de por sí poco inmunogénicos, se unen covalentemente a proteínas transportadoras, dando lugar a conjugados capaces de producir altos niveles de inmunidad. Existen algunos factores que determinan la inmunogenicidad de la vacuna conjugada y por lo tanto influyen en la respuesta producida: el tamaño molecular del complejo (al aumentar el tamaño del complejo aumenta la respuesta); la longitud del polisacárido; la proteína transportadora y la orientación de su epítipo dentro del complejo; la relación sacárido/proteína (al aumentar, aumenta la inmunogenicidad del péptido transportador); o la conjugación química. La respuesta es timo-dependiente, mejorando la inmunidad en niños pequeños (menores de 18 meses) y consiguiendo una memoria inmunológica que permanece durante años. Estas quimeras proteicas de polisacáridos también se han empleado en la industria alimentaria. Las interacciones entre polisacáridos y proteínas juegan un papel importante en la estructura y estabilidad de muchos alimentos procesados [131]. Por ejemplo, las proteínas, en general, presentan buenas propiedades emulsionantes. Sin embargo, sus propiedades pueden variar en función del pH, concentración salina y temperatura del medio. La conjugación covalente de las proteínas con mono-, di- o polisacáridos mejora significativamente sus propiedades emulsionantes y estabilidad al calor, especialmente cuando la conjugación se realiza con dextranos [132], lo que se asocia a la combinación que presentaría la glicoproteína de alto peso molecular resultante de la conjugación, de las propiedades hidrofóbicas características de las proteínas, con las propiedades hidrófilas típicas de los polisacáridos [131]. Así, estas quimeras pueden reemplazar a emulsionantes sintéticos de bajo peso molecular en productos alimenticios procesados, con la ventaja de que aportan un valor nutricional añadido y son consideradas más saludables [131].

Hasta ahora, no se ha descrito el empleo de quimeras polisacárido-proteína, como biorreactivos en el desarrollo de inmunoensayos. Sin embargo, la unión covalente de redes de dextrano a la superficie de una proteína portadora podría servir de medio para

aumentar el número de grupos funcionales disponible en la misma, empleados posteriormente para la unión del hapteno. De esta forma, se podrían sintetizar conjugados con un mayor número de moléculas de hapteno por unidad proteica que cuando se emplean proteínas sin modificar. Además, la red de dextrano, de carácter hidrofílico y gran flexibilidad, actuaría de brazo espaciador, favoreciendo el acceso del Ab al hapteno. La longitud del brazo espaciador de dextrano es un factor importante a considerar, ya que, en principio, la sensibilidad del inmunoensayo mejoraría al aumentar la longitud del mismo, ya que se evitaría el enmascaramiento del hapteno por la superficie de la proteína. No obstante, si el brazo espaciador es demasiado largo, podrían producirse plegamientos del mismo y reducirse la exposición del hapteno al Ab.

### **2.3. Métodos analíticos para la determinación de triazinas, fluoroquinolonas y microcistinas.**

Los métodos analíticos para la determinación de residuos de contaminantes, ya sean herbicidas, antibióticos, o toxinas naturales, incluyen generalmente una etapa de extracción, una etapa de limpieza y/o preconcentración y finalmente la etapa de análisis. En la etapa de extracción, el analito objeto de estudio se separa de la matriz (suelos, alimentos, etc.) a un extracto, el cual, en caso de ser necesario, se somete posteriormente a una etapa de limpieza, para eliminar otros posibles componentes extraídos de la matriz, y se concentra a un volumen menor. Por último, el extracto concentrado, o una fracción del mismo, se analiza empleando una técnica que permita detectar selectivamente el contaminante y cuantificar su concentración en la muestra.

Existe una elevada variedad de métodos disponibles para llevar a cabo la determinación tanto de TRZs como de FQs o MCs. A continuación se recogen algunos trabajos destacados, publicados en los últimos años.

#### **2.3.1. Tratamiento de la muestra: métodos de extracción, limpieza y preconcentración.**

El método elegido para llevar a cabo el tratamiento de una muestra, previo su análisis, dependerá tanto del compuesto a analizar como de la naturaleza de la muestra en la que se encuentre (matriz). Dada la complejidad de algunas matrices, esta etapa es crítica a la hora de desarrollar un método analítico y limitará, en muchos casos, la sensibilidad y robustez del mismo. En la actualidad, se tiende a desarrollar procesos automáticos que reduzcan tanto la manipulación de la muestra como el tiempo de

análisis, intentando minimizar el consumo de disolventes orgánicos y la cantidad de muestra empleada.

Este apartado resume los procedimientos principales descritos en bibliografía para el tratamiento de muestra, clasificados en función de la matriz a analizar. Se distinguen cuatro tipos de matrices: 1) aguas; 2) muestras de origen animal; 3) muestras de origen vegetal y 4) suelos y lodos. Se ha prestado una atención especial a las muestras de aguas y, en el caso puntual del análisis de las Qs, a los alimentos de origen animal, al ser estas las matrices estudiadas en el presente trabajo de tesis.

#### 2.3.1.1. Aguas.

El contenido de contaminantes en muestras de agua es, generalmente, muy bajo (del orden de  $\text{ng L}^{-1}$ ). Se han descrito algunos métodos que permiten el análisis directo en aguas superficiales de varios de los contaminantes descritos anteriormente, sin ningún tratamiento previo de la muestra, salvo la filtración (para eliminar partículas en suspensión) o el ajuste del pH y/o fuerza iónica de la misma. Este es el caso de los ensayos ELISA [134,135] o los (bio)sensores [136,137] descritos para el análisis de MCs o la detección de TRZs, a concentraciones inferiores al contenido máximo legislado, mediante inmunoensayos en flujo [138-140]. No obstante, la mayoría de los métodos publicados para el análisis de contaminantes en este tipo de matriz incluyen una etapa de preconcentración y limpieza de la muestra.

Inicialmente, esta etapa se realizaba mediante extracción líquido-líquido (LLE, del inglés *liquid-liquid extraction*). Sin embargo, hoy en día lo más habitual es que se emplee un proceso de extracción en fase sólida (SPE, del inglés *solid-phase extraction*), ya sea en modo *on-line* o modo *off-line*. Los sorbentes empleados son muy variados: alquil-sílices (generalmente  $\text{C}_{18}$ ), materiales poliméricos (e.g. poliestireno-divinilbenceno, PS-DVB, del inglés *polystyrene-divinylbenzene*), intercambiadores iónicos y otros.

La Tabla 13 recoge las características analíticas de algunos de los métodos de análisis de los contaminantes estudiados en la presente Tesis, en muestras de aguas continentales.

Uno de los factores críticos a la hora de optimizar el proceso de extracción SPE es el pH de la muestra, ya que su valor va a condicionar la interacción de los componentes de la misma con la fase estacionaria [141]. Generalmente, previo al análisis de FQs y TRZs en muestras acuosas, el pH se ajusta a valores ácidos ( $\text{pH} < 4.5$ ). De este modo, los analitos se encuentran principalmente en su forma catiónica, favoreciendo su retención en sorbentes poliméricos y permitiendo la eliminación de la materia orgánica,

en forma aniónica. Además, el pH ácido ayuda a inhibir el crecimiento bacteriano, por lo que es una práctica recomendada habitualmente para el análisis muestras de aguas. Otra práctica utilizada para inhibir el crecimiento bacteriano es el empleo de azida [142].

El ajuste de pH de la muestra puede acompañarse con el uso de agentes quelatantes (EDTA [143], ácido oxálico, ácido cítrico [136]) que eviten la formación de complejos estables de los analitos diana con cationes metálicos di- y polivalentes presentes en la matriz [144].

Otro parámetro clave cuando se aplica la SPE en la preconcentración de aguas medioambientales es el volumen de ruptura de los distintos adsorbentes ya que, en ocasiones, es necesario preconcentrar grandes volúmenes de muestra (0.5 – 1 L) para alcanzar el límite de detección requerido. Por este motivo, habitualmente se emplean materiales con elevada área superficial específica, como LiChrolut, Oasis® o Isolute ENV, para la preconcentración y limpieza de aguas cuando se quiere analizar contaminantes como FQs, TRZs o MCs.

Los sorbentes clásicos de SPE no son selectivos por lo que, de cara a mejorar la eficiencia del proceso reduciendo la co-extracción de interferencias de la matriz, es habitual el empleo de fases estacionarias selectivas. Por ejemplo, se han desarrollado MIPs selectivos a Qs [145-147], TRZs [148-152] y MCs [153], que se han aplicado para la extracción de los analitos de interés en muestras de agua, empleando distintas configuraciones (SPE *off-line*, SPE *on-line* o partículas magnéticas recubiertas) así como para el desarrollo de sensores [136]. En este tipo de materiales, la presencia de interferencias (ácidos húmicos, macromoléculas o sales) puede afectar a la retención de los analitos, aunque este efecto puede reducirse, en ocasiones, mediante un control adecuado del pH de la muestra, por lo que, de nuevo, el pH es un factor crítico a la hora de optimizar la etapa de tratamiento. Otro inconveniente descrito en algunos casos cuando se emplean MIPs es el bajo volumen de ruptura del polímero, que obliga a utilizarlo en combinación con sorbentes comerciales [151,152], para llevar a cabo una preconcentración eficaz.

Además de los MIPs, los inmunosopores también se emplean como adsorbentes selectivos en el tratamiento de aguas. El uso de columnas de inmunoafinidad para la preconcentración y limpieza de muestras de agua se ha descrito en el análisis de TRZs [154,155] y MCs [142,156-158].

En la actualidad se están desarrollando nuevos materiales para la adsorción selectiva de contaminantes basados en el empleo de aptámeros. Este es el caso, por ejemplo, del aptámero (RNA) desarrollado por Hu y col. [159] que, unido a láminas de grafeno, permite la adsorción selectiva de MCLR, la cual puede ser revertida fácilmente

mediante el control de la temperatura y/o la fuerza iónica del medio. Teóricamente, estos materiales podrían aplicarse tanto en el campo del análisis (pretratamiento de la muestra) como para la separación de moléculas en la purificación de aguas contaminadas.

Otras técnicas, de desarrollo más reciente, empleadas en el tratamiento de aguas continentales son la microextracción en fase sólida (SPME, del inglés *solid-phase microextraction*), la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME, del inglés *dispersive liquid-liquid microextraction*), la microextracción líquida en fibra hueca (HF-LPME, del inglés *hollow-fiber liquid phase microextraction*), la extracción por adsorción en barra agitadora (SBSE, del inglés *stir bar sorptive extraction*) y los muestreadores pasivos [160,161].

La SPME emplea fibras de sílice fundida recubiertas de una fase estacionaria apropiada para adsorber los analitos de interés de extractos acuosos, los cuales se desorben posteriormente con disolventes orgánicos convencionales o disoluciones acuosas de surfactantes (SPME-MD, del inglés *solid-phase microextraction and micellar desorption*). Si el análisis se realiza mediante cromatografía de gases (GC, del inglés *gas chromatography*), la desorción de la fibra puede llevarse a cabo directamente en el inyector del cromatógrafo. Empleando esta técnica, se reduce el volumen de muestra, así como el consumo de disolventes orgánicos y el grado de manipulación. Además, presenta la ventaja de que las fibras pueden reutilizarse. Se ha empleado principalmente como técnica de pretratamiento en el análisis de medicamentos en fluidos humanos y muestras acuosas, y en el análisis de herbicidas y pesticidas en muestras de agua. Así, se ha descrito su uso en la extracción de FQs [162,163] y TRZs [164-167]. Aunque también se ha aplicado a la extracción de MCs [168,169], algunos autores han descartado esta técnica para el análisis de péptidos en muestras de aguas, por considerar que los tiempos necesarios para que la extracción sea cuantitativa son excesivamente largos [170].

La extracción DLLME, introducida por Assadi y col. en 2006 [171], es un método simple y rápido, que permite la extracción cuantitativa de los contaminantes con un bajo consumo de disolvente y, por tanto, proporciona un alto factor de concentración. La extracción DLLME se basa en la inyección del disolvente de extracción junto con un agente dispersante en el interior de la muestra acuosa, dando lugar a una mezcla turbia, en la cual finas gotas del disolvente de extracción quedan dispersas en la fase acuosa. De este modo se aumenta notablemente la superficie de contacto entre las fases y se reduce el tiempo de extracción. Tras la extracción, la mezcla se centrifuga y los analitos, en la fase más densa, se determinan por métodos cromatográficos o espectrométricos.

El uso de esta metodología se ha descrito para el análisis de FQs en aguas residuales [172], MCs en agua de embalse [173], y TRZs en agua potable y agua de río [174,175].

Otra alternativa es la extracción HP-LPME, introducida por Audunsson [176] y desarrollada Thordarson y col. [177] y Pedersen-Bjergaard y Rasmussen [178] como alternativa a la extracción LPME (del inglés *liquid phase microextraction*). En esta técnica, los analitos de interés se extraen desde una muestra acuosa a una disolución aceptora, ubicada en el interior de una fibra hueca, cuyos poros están impregnados de un disolvente orgánico. Si la disolución aceptora es una fase orgánica, el procedimiento se conoce como HF-LPME de dos fases, mientras que, si es una disolución acuosa, recibe el nombre de HF-LPME de tres fases. En el sistema de dos fases el extracto final que se obtiene es una fase orgánica compatible con técnicas analíticas tales como GC o cromatografía de líquidos (LC, del inglés *liquid chromatography*). En el sistema de tres fases, el analito se extrae desde una fase acuosa (dadora) hasta otra fase acuosa (aceptora, en el interior de la fibra), actuando la fase orgánica que impregna los poros de la fibra como una barrera entre las dos disoluciones acuosas, e impidiendo su mezcla. Esta modalidad suele asociarse con las técnicas de LC o CE y está limitada a analitos con comportamiento ácido-base. Una de las ventajas que aporta es que proporciona extractos muy limpios, ya que las macromoléculas que pudieran estar en la muestra de partida no acceden a la fase aceptora, dada su insolubilidad en la fase orgánica presente en los poros de la fibra, aparte de que su entrada en los poros también podrá verse limitada por el pequeño tamaño de los mismos. Su uso se ha descrito para el análisis de gran variedad de contaminantes, entre los que se encuentran las FQs [179] y las TRZs [180].

La extracción SBSE presenta un mecanismo similar al de la extracción SPME. En este caso se emplea una barra de agitación recubierta con una fase sólida (*i.e.* PDMS), que se introduce en la muestra acuosa. Durante el proceso de extracción, los analitos de interés quedan retenidos en dicha fase, de la que pueden ser desorbidos, posteriormente, empleando disolventes orgánicos (SBSE-LD, del inglés *stir bar sorptive extraction and liquid desorption*), o mediante tratamientos térmicos (SBSE-TD, del inglés *stir bar sorptive extraction and thermal desorption*), lo que permite, por ejemplo, la desorción de los analitos retenidos directamente en el inyector de un cromatógrafo de gases. Son muchos los ejemplos del uso de esta técnica de extracción para el análisis de contaminantes en aguas continentales. Se ha empleado para la extracción de TRZs de aguas de embalse [181], agua de río [182] y aguas subterráneas [183]. Aunque menos extendido, su uso también se ha descrito para la extracción de Qs en aguas residuales [184].



Los muestreadores pasivos intentan suplir las limitaciones de los muestreos tradicionales, basados en la toma de una o varias muestras discretas con una frecuencia temporal determinada. El muestreo tradicional permite tener una información muy limitada respecto a la variabilidad espacial y temporal de la concentración de la toxina monitorizada. Por el contrario, los muestreadores pasivos permiten la monitorización temporal de contaminantes, a bajo coste y, en muchos casos, con mayor sensibilidad, al extraer los contaminantes de grandes volúmenes de agua [185]. Generalmente se trata de dispositivos permeables a la muestra, rellenos de un material adsorbente o disolvente de extracción. Al ponerse en contacto con la muestra, esta difunde a través de la barrera permeable, entrando en contacto con el adsorbente, en el cual se van acumulando los compuestos objeto de estudio. Son dispositivos fáciles de utilizar y su uso es cada vez más habitual cuando se quiere monitorizar de forma continua la presencia de contaminantes y toxinas medioambientales [186,187]. Se ha descrito, por ejemplo, el uso de muestreadores SPATT (del inglés *solid phase adsorption toxin tracking*) para la monitorización de MCs [188,189], muestreadores POCIS (del inglés *polar organic chemical integrative samplers*) aplicados al análisis de MCs [190,191] y TRZs [192], o muestreadores MAPS (del inglés *membrane assisted passive sampler*) para la extracción de TRZs [193].

Cuando se lleva a cabo el análisis de MCs en aguas continentales, en ocasiones interesa conocer tanto la concentración de MCs disuelta en la muestra como la toxicidad latente de un afloramiento bacteriano, con el objetivo de predecir los efectos que se pueden producir tras la lisis de las cianobacterias que lo conforman. Con este fin se analiza el contenido intracelular de MCs, o concentración de toxinas en el interior de la cianobacteria.

Para el análisis de las toxinas intracelulares, es necesario llevar a cabo una primera etapa de extracción, en la cual la muestra se somete a unas condiciones tales que produzcan la lisis o ruptura de la pared celular de las cianobacterias. Esta etapa se realiza, generalmente, mediante procesos de liofilización, ciclos de congelación-descongelación o extracción asistida por radiación de ultrasonidos (UAE, del inglés *ultrasound-assisted extraction*). Entre los disolventes más empleados para la etapa de extracción encontramos ácido acético (5%), metanol (MeOH), mezclas MeOH:agua con alto contenido orgánico (75%) o mezclas ternarias agua:MeOH:n-butanol. Tras la etapa de extracción, las muestras se centrifugan con el objetivo de separar compartimentos y orgánulos celulares de la fase soluble (que contiene las MCs) la cual se somete después a un proceso SPE de limpieza y preconcentración, previamente descrito [142,194,195].

Tabla 13. Métodos de análisis para la determinación de MCs, FQs y TRZs en aguas.

Compuestos determinados	Matriz	Preconcentración y limpieza	Técnica de determinación	LOD/LQD (ng L <sup>-1</sup> )	Ref
Microcistinas					
MCLR, -YR, -RR	Agua de río	1) SLE ([MCs] <sub>intracelular</sub> ) o SPE (Microcystin ImmunoSep™) ([MC] <sub>libre</sub> ) 2) SPE (C <sub>18</sub> )	a) HPLC-UV b) HPCE-UV	[MCs] <sub>intracelular</sub> a) 17-22/57-73 b) 13-20/42-65 [MCLR] <sub>libre</sub> a) 20/164 b) 2/7	[142]
MCLR, -YR, -RR	Agua de lago	SPE (Sep-Pack PS-2 + Inmunoadfinidad, tándem)	HPLC-ESI-MS	--	[158]
15 MCs y nodularina	Aguas superficiales	a) SPE (ImmunoSep™) b) SPE (Oasis HLB)	HPLC-ESI-MS	a) 40-56/-- b) 100/--	[157]
MCLR, -YR, -RR, Nodularina	Agua de grifo	SPE (MIP)	Sensor piezoeléctrico (MIP)	350/--	[136]
MCLR, -LA, -LF, -LW, -RR, -YR	Agua de lago y embalse	[MCs] <sub>intracelular</sub> :1) UAE; 2) SPE (C18) [MCs] <sub>libre</sub> : SPE (C18)	HPLC-ESI-MS/MS	0.002/0.01	[194]
MCLR, -RR, -YR, -LA	Agua de lago	[MCs] <sub>intracelular</sub> :1) UAE; 2) SPE (LiChrolut RP-18) [MCs] <sub>libre</sub> : SPE (LiChrolut RP-18)	HPLC-ESI-MS/MS	0.75/2.25	[195]
MCLR, -YR, -RR	Agua de estanque	SPME (fibra CW-TPR)	HPLC-UV	100/--	[168]
MCLR, -RR	Agua de lago	SPME (fibra CW-TPR)	HPLC-QTOF-MS	300-800/--	[169]

Tabla 13. Continuación.

Compuestos determinados	Matriz	Preconcentración y limpieza	Técnica de determinación	LOD/LQD (ng L <sup>-1</sup> )	Ref
MCLR	Agua de embalse	DLLME	HPLC-MS/MS	30/150	[173]
Fluoroquinolonas					
4 FQs	Agua residual y de hospital	SPE (SAX-Oasis HLB tándem)	HPLC-FLD	8.5-17/25-250	[144]
2 FQs*	Agua residual	On-line SPE (Hypersil Gold C <sub>18</sub> )	HPLC-ESI-MS/MS	29-61/--	[196]
5 FQs	Agua residual	SPE (Oasis HLB)	UHPCL-APCI-MS/MS	2.5-25/12.5-125	[143]
4 Qs	Agua residual	SBSE-LD (material monolítico)	HPLC-DAD	370-560/1220-1860	[184]
8 Qs	Agua de río	SPE (MIP)	HPLC-FLD	10-270/--	[145]
6 FQs	Aguas de río, de lago y residual	SPE (MIP)	HPLC-ESI-MS/MS	3.2-6.2/--	[146]
5 FQs	Agua de río y residual	On-line (in-tube) SPME (Carboxen™-1010 PLOT)	HPLC-API-MS/MS	7-29/--	[162]
5 FQs	Agua de mar, superficial y residual	SPME-MD (fibras CW-TPR)	HPLC-FLD	10-200/30-600	[163]
10 Qs*	Agua superficial y subterránea	On-line SPE (C <sub>-18</sub> )	HPLC-ESI-MS/MS	0.4-4.3/--	[197]
4 Qs	Agua residual	UA-DLLME	HPLC-DAD	140-810/--	[172]
8 FQs	Agua residual, superficial y potable	HF-LPME	HPLC-DAD-FLD	0.3-16/1-50	[179]

3 FQs*	Agua de río	HF-LPME	UHPCL-ESI-MS/MS	40-60/140-200	[198]
6 FQs	Agua potable y de piscifactoría	On-line SPE (MIP)	HPLC-FLD	1-12/--	[147]
18 Qs*	Agua de costa	SPE (Oasis HLB + Oasis MCX, en tándem)	HPLC-ESI-MS/MS	--/0.13-2.35	[199]
<b>Triazinas</b>					
14 TRZs/ metabolitos	Agua superficial	SPE (MIP + PS-DVB)	HPLC-DAD	--/--	[150]
5 TRZs*	Agua superficial	SPE (C <sub>18</sub> )	HPLC-DAD	20-40/--	[200]
ATR, SIM	Agua de río, de embalse, potable y residual	a) SPE (C <sub>18</sub> ) b) SPE (nanotubos de carbono)	HPLC-DAD	9-33/--	[201]
ATR, DEA	Agua de embalse y sedimentos	SPE (C <sub>18</sub> )	GC-ITMS/MS	0.13-0.75/--	[202]
ATR, SIM*	Agua de drenaje agrícola	SPE (SDB-XC Empore™, discos)	HPLC-DAD	100/--	[203]
4 TRZs/ metabolitos	Agua superficial	On-line SPE (Oasis HLB)	HPLC-MS/MS	0.5/--	[204]
5 TRZs/ metabolitos	Agua potable	SPE (arcilla)	HPLC-DAD	900-2000/3000-10000	[205]
11 TRZs/ metabolitos	Agua de río	SPE (MIP + LiChrolut EN)	HPLC-DAD	30-100/--	[152]
ATR, SIM	Agua de río y potable	SPE (tierra de diatómeas)	HPLC-UV	210-240/--	[206]
8 TRZs/ metabolitos	Agua medioambiental	HF-LPME	GC-MS	7-63/--	[180]

Tabla 13. Continuación.

Compuestos determinados	Matriz	Preconcentración y limpieza	Técnica de determinación	LOD/LQD (ng L <sup>-1</sup> )	Ref
4 TRZs*	Agua subterránea	SPME (fibras PDMS-DVB)	GC-MS/MS	4-131/--	[164]
4 TRZs*	Agua subterránea, de mar, de río y de lago	SPME (fibras PDMS-PA)	GC-NPD-MS	5-90/--	[165]
4 TRZs	Agua de lago, de río y de embalse	SBSE (grafeno)	HPLC-DAD	25-40/75-120	[207]
ATR, SIM	Agua de pozo y potable	SPE (carbón de bambú)	HPLC-UV	100/--	[208]
5 TRZs/ metabolitos	Agua subterránea, de arroyo y potable	On-line SPME: a) CNFs; b) MIP + NVP-DVB, tandem	HPLC-DAD	a) 4-30/10-90 b) 20-40/70-120	[209, 210]
10 TRZs/ metabolitos	Agua subterránea	SBSE-TD (Twisters)	GC-MS	0.2-3.4/0.7-11.3	[183]
7 TRZs/ metabolitos	Agua de pozo y de embalse	SBSE-LD (PU)	HPLC-DAD	100-500/500-1700	[181]
8 TRZs/ metabolitos	Agua de río y potable	DLLME	GC- MS	21-120/--	[174]

\*Multiclase. API: ionización a presión atmosférica; APCI: ionización química a presión atmosférica; CNFs: nanofibras de carbono; CW-TPR: Carbowax/Templated Resin; DAD: detector de hilera de diodos; DLLME: microextracción dispersiva líquido-líquido; ESI: ionización por electrospray; FLD: detector de fluorescencia; FQs: fluoroquinolonas; GC: cromatografía de gases; HF-LPME: microextracción líquida en fibra hueca; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; ITMS: espectrometría de masas con trampa de iones; LOD: límite de detección; LQD: límite de cuantificación; MCs: microcistinas; MIP: polímero de impronta molecular; MS: espectrometría de masas; NPD: detector termiónico de llama; NVP-DVB: N-vinilpirrolidona/divinilbenzeno; PDMS: polidimetilsiloxano; PDMS-DVB: polidimetilsiloxano-divinilbenzeno; PS-DVB: poliestireno-divinilbenzeno; PA: poliacrilato; PU: poliuretano; QTOF: cuadrupolo de tiempo de vuelo; SAX: cartuchos de intercambio aniónico; SBSE: extracción por adsorción en barra agitadora; SBSE-LD: extracción por adsorción en barra agitadora y desorción líquida; SBSE-TD: extracción por adsorción en barra agitadora y desorción térmica; SLE: extracción sólido-líquido; SPE: extracción en fase sólida; SPME: microextracción en fase sólida; SPME-MD: microextracción en fase sólida y desorción micelar; TRZs: triazinas; UAE: extracción asistida por radiación de ultrasonidos; UA-DLLME: microextracción dispersiva líquido-líquido combinada con ultrasonidos; UPCL: cromatografía líquida de ultra-resolución; UV: detector de ultravioleta.

### 2.3.1.2. Muestras de origen animal.

Las muestras de origen animal son, en general, matrices de gran complejidad, por lo que la etapa de tratamiento de muestra es, en este caso, de especial importancia.

Los alimentos de origen animal constituyen la principal fuente de exposición a residuos de **Qs** y **FQs** para los seres humanos, lo que hace necesario disponer de métodos de análisis que permitan su detección en este tipo de matrices. En los últimos años se han descrito un amplio número de métodos para la determinación de residuos de **Qs** y **FQs** en muestras de alimentos, siendo pescado [211-216], leche [215,217,218] y huevo [219-223] las matrices más estudiadas [23]. Los tejidos animales de músculo, hígado, riñón o grasa (de vacuno, aves de corral, cerdo) también se analizan de forma habitual [224-230]. La Tabla 14 resume alguno de los métodos disponibles en la bibliografía para la determinación de **Qs** y **FQs** en muestras de origen animal.

En general, el tratamiento de este tipo de matrices incluye una etapa de extracción, seguida de un proceso de preconcentración y limpieza del extracto. Las **Qs** y las **FQs** son solubles en medios acuosos ácidos o básicos, así como en disolventes orgánicos polares, pero no en disolventes orgánicos apolares (hexano, tolueno). Su extracción de matrices animales se ha descrito empleando disolventes orgánicos de alta o media polaridad (acetato de etilo, acetona, acetonitrilo (AcN), etanol, MeOH, cloroformo o diclorometano), mezclas hidro-orgánicas ácidas o básicas o incluso medios acuosos tamponados. Entre las técnicas más empleadas se encuentran la extracción clásica por agitación; la extracción UAE, la extracción asistida por microondas (MAE, del inglés *microwave-assisted extraction*), la extracción con fluidos supercríticos (SFE, del inglés *supercritical fluid extraction*) y la extracción con líquidos presurizados (PLE, del inglés *pressurized liquid extraction*).

La extracción clásica por agitación es una técnica sencilla y de bajo coste que puede proporcionar buenas recuperaciones, ventajas que hacen que no haya caído en desuso, aplicándose a muestras de origen animal tanto sólidas (SLE, del inglés *solid-liquid extraction*) como líquidas o semilíquidas (LLE). Así, la LLE ha sido aplicada con éxito, por ejemplo, al análisis de **FQs** en muestras de huevo [220,222]. Aunque las recuperaciones obtenidas son buenas ( $\geq 60\%$ ) los procesos de extracción conllevan un alto grado de manipulación de la muestra, al ser necesarias varias etapas de extracción. Además, el consumo de disolvente es elevado, y los extractos obtenidos deben ser centrifugados y/o sometidos a una etapa de limpieza adicional, lo que alarga el tiempo de análisis.

La UAE permite una extracción efectiva a temperatura ambiente y presión atmosférica [219,226,231]. Sin embargo, los tiempos de extracción no se reducen y los extractos resultantes suelen contener un gran número de interferencias co-extraídas de la matriz, por lo que es necesaria una etapa posterior de limpieza previa al análisis.

Una alternativa que permite evitar este problema es la SFE. Además, esta técnica puede automatizarse fácilmente empleando la instrumentación adecuada y facilita una disminución del consumo de disolventes, lo cual resulta muy atractivo desde el punto de vista medioambiental. La SFE se ha aplicado a la extracción de Qs en muestras de huevo [223], permitiendo el análisis directo de los extractos resultantes por cromatografía. Sin embargo, el proceso de extracción es largo (60 min por muestra), ya que previa a la extracción es necesaria una etapa de eliminación de la matriz lipídica. Además, el precio de la instrumentación es elevado.

La MAE presenta la ventaja de reducir tanto el tiempo de extracción como el consumo de disolventes orgánicos, permitiendo la extracción simultánea de más de una muestra. Aunque su uso para la extracción de Qs y FQs en matrices de origen animal está descrito en bibliografía [232–234], esta técnica no se utiliza mucho para muestras de alimentos debido a que la eficacia del método se ve limitada cuando el contenido en agua en las muestras es elevado, siendo necesario, en ocasiones, aplicar una etapa previa de liofilización, que alarga la etapa de tratamiento de la muestra. Además, no es una técnica fácil de automatizar y los equipos son caros.

Otra técnica empleada para la extracción de FQs de muestras de origen animal es la PLE. Esta técnica se utilizaba tradicionalmente para la extracción de contaminantes de muestras medioambientales (suelos, sedimentos y lodos), sin embargo, su uso se ha extendido a otras áreas, incluyendo la industria alimentaria [235]. La técnica es adecuada para el tratamiento de muestras sólidas o semisólidas y permite acortar los tiempos del proceso de extracción y reducir el volumen de disolvente utilizado, empleando métodos totalmente automatizados. Se ha aplicado con éxito en la extracción de Qs de muestras de alimentos infantiles [236], piensos [237] y tejidos porcinos, bovinos, de pollo y pescado [238].

Como se ha indicado anteriormente, por lo general, los procesos de extracción de Qs en muestras de origen animal no son selectivos y la co-extracción de especies interferentes puede dificultar el análisis e incluso enmascarar la señal analítica del compuesto monitorizado, incrementando el límite de detección del método analítico. Por ello, en muchos casos es necesaria una etapa posterior de limpieza o *clean-up* del extracto para eliminar las especies interferentes, evitando la pérdida del analito. La

mayoría de los procedimientos de limpieza descritos hasta el momento incluyen una extracción LLE y/o SPE [23].

Generalmente, la LLE es la técnica empleada cuando las Qs se extraen con disolventes orgánicos puros (e.g. acetato de etilo, diclorometano). El extracto se trata con ácido trifluoroacético, ácido tricloroacético y/o disolventes no polares (hexano o éter dietílico) para eliminar el contenido proteico y/o graso. Posteriormente, el extracto se lleva a sequedad y se reconstituye en un medio acuoso tamponado. La LLE también se ha descrito para la limpieza de extractos acuosos. En este caso, los analitos se transfieren mediante LLE a una fase orgánica (cloroformo, diclorometano o acetato de etilo) controlando el pH de la fase acuosa, dado el carácter ácido-base de las FQs. La eficiencia del proceso se puede incrementar adicionando NaCl. Este tipo de procedimiento de limpieza de extractos acuosos suele combinarse con etapas de desgrasado empleando hexano o éter dietílico y, en ocasiones, con etapas adicionales de SPE [23].

Los procesos de limpieza basados en SPE se aplican por regla general a los extractos obtenidos empleando disolventes de extracción polares [23]. En algunos casos, al igual que en los procesos de limpieza mediante LLE, se lleva a cabo la precipitación de proteínas y/o desgrasado del extracto, previo al proceso SPE. Esta etapa puede realizarse en distintos formatos, tanto en sistemas *off-line* (SPE dispersiva [211] o DSPE, del inglés *dispersive solid-phase extraction*, cartuchos, discos o placas de 96 pocillos [239]) como *on-line*, en forma de columnas empaquetadas o fibras recubiertas, siendo hasta el momento la configuración *off-line* de uso más común. En general, se emplean cartuchos de fase inversa (normalmente C<sub>18</sub> y en ocasiones C<sub>8</sub> o C<sub>2</sub>) [219, 240-242] o fases poliméricas de di-vinilbenceno/N-vinilpirrolidona (Oasis HLB) o PS-DVB [234,238,243]. La muestra se carga en el cartucho previo ajuste del pH y, tras el lavado del mismo (con agua, disoluciones acuosas ácidas, mezclas acuosas con un contenido bajo en AcN o MeOH, o incluso hexano), los analitos se eluyen del cartucho empleando disoluciones acuosas ácidas o básicas con un alto contenido en MeOH (> 75%), con MeOH puro o, en algunas ocasiones, disoluciones acuosas ácidas o básicas de AcN. También se ha descrito el empleo de cartuchos de intercambio iónico y mixto [244-246]. En este caso el cartucho se lava empleando disolventes orgánicos puros, y los analitos se eluyen con mezclas de MeOH:NH<sub>3</sub>.

Algunos autores han propuesto el empleo de cartuchos SPE de diferente naturaleza, en tándem, con el objetivo de mejorar la etapa de limpieza, eliminando un mayor número de interferencias [218]. En este caso, el eluato del primer cartucho se lleva a



sequedad y la muestra se redisuelve en un el disolvente adecuado para su carga en el segundo cartucho SPE.

Los adsorbentes convencionales empleados en SPE no son selectivos y, si bien suelen proporcionar buenos resultados, en ocasiones no permiten eliminar de forma eficaz las interferencias presentes en extractos de matrices complejas, lo que ha conducido al desarrollo de nuevos materiales basados en mecanismos de reconocimiento molecular selectivos. Dentro de este grupo se incluyen los soportes de afinidad o inmunosorbentes [247,248], basados en interacciones Ag-Ab, y los MIPs. Los MIPs compiten con las fases convencionales de SPE y los inmunosorbentes en términos de selectividad, estabilidad y coste, y se han aplicado al análisis de FQs en alimentos infantiles [249,250], huevos [229,251] y en matrices de leche y riñón [252].

La tendencia actual en este área se dirige al empleo de métodos de análisis rápidos, con una mínima manipulación de la muestra, lo cual ha favorecido al desarrollo de procedimientos de extracción alternativos que facilitan el análisis directo del extracto sin necesidad de una etapa de limpieza adicional. Entre estos procedimientos podemos destacar la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, del inglés *matrix solid-phase dispersion*), que también se ha aplicado con éxito a la extracción de FQs en muestras de origen animal [229,230,253,254]. En este caso, la muestra (sólida, semisólida o viscosa) se dispersa en un soporte sólido abrasivo (sílice, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, florisil, etc), generalmente mediante trituración manual. Esta mezcla se transfiere a una columna y los analitos se eluyen del soporte empleando el disolvente o la mezcla apropiados. Las interferencias se quedan atrapadas en el soporte sólido o se eliminan en una etapa de lavado previa. Esta técnica combina las etapas de extracción y limpieza, características de la SPE, en una sola etapa, simplificando el procedimiento analítico y reduciendo considerablemente el consumo de disolventes, la manipulación de la muestra y el tiempo de análisis.

Otra técnica relativamente nueva de preparación de muestra, que permite llevar a cabo la extracción en línea, es la cromatografía de flujo turbulento (TFC, del inglés *turbulent flow chromatography*). En este caso, la muestra, disuelta generalmente en medio acuoso, se inyecta en una precolumna que contiene como fase estacionaria un material de acceso restringido (RAM, del inglés *restricted access material*), de forma que las moléculas de mayor tamaño molecular (e.g. proteínas) son arrastradas por la fase móvil hacia el desecho mientras que las de pequeño tamaño (analitos) difunden hacia el interior de los poros del sorbente y son eluidos posteriormente con el disolvente adecuado, en modo de elución *back-flush*, hacia la columna analítica, para su posterior separación y análisis. Esta técnica se ha empleado en la determinación de FQs en muestras de tejido animal [255]. Presenta la ventaja de poder automatizarse con

facilidad, reduciendo la manipulación de la muestra y el tiempo de análisis. Sin embargo, el consumo de disolvente es elevado.

Por último, otras técnicas de limpieza de muestra para el análisis de FQs descritas en la bibliografía son aquellas basadas en sistemas de diálisis [221,256,257] y membranas de ultrafiltración.

Recientemente, con el objetivo de llevar a cabo análisis multirresiduo de forma rápida y económica, se han desarrollado nuevas técnicas de extracción, como es el caso de la metodología QuEChERS (del inglés *quick, cheap, effective, rugged and safe*), descrita por primera vez por Anastassiades y Lehotay en 2003 [258]. Esta técnica emplea disolventes miscibles con el agua (AcN, acetona) para extraer los analitos diana de una cantidad de muestra pequeña. La adición de sales ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ) y el control adecuado del pH de la fase acuosa induce la separación de dos fases y la migración del analito de la fase acuosa a la fase orgánica. Stubbings y col. [259] han aplicado este método al análisis multirresiduo de medicamentos veterinarios (incluyendo FQs) en tejidos de origen animal y Li y col. [260] lo han usado para la extracción de FQs en muestras de pescado. En la actualidad es posible encontrar kits comerciales de extracción QuEChERS aplicados al análisis de FQs en matrices de origen animal [261]. Aunque este tipo de metodología permite la extracción simultánea de compuestos de distinta naturaleza en matrices complejas, lo que es necesario de cara al desarrollo de métodos de análisis multirresiduo o multianalito, tras el proceso de extracción sigue siendo necesaria una etapa de limpieza del extracto, que se realiza generalmente mediante SPE.

En muestras de origen animal es posible encontrar, junto con los residuos de medicamentos veterinarios, residuos de pesticidas ya que los animales pueden estar expuestos a ellos a través del agua, alimentos, etc. Un ejemplo es el caso de los herbicidas de la familia de los **TRZs**.

Las TRZs se acumulan en los tejidos grasos por lo que, cuando se analizan muestras de origen animal, es necesario separar la grasa de otros tejidos, empleando procesos selectivos de extracción (e.g. en muestras de leche, huevo) o aislando la grasa (e.g. en carnes) [262,263]. Tras la separación de la grasa, se lleva a cabo la extracción de las TRZs empleando los métodos de extracción descritos previamente. Así, la extracción de TRZs en matrices de origen animal se ha llevado a cabo mediante extracción Soxhlet [264,265], UAE [264,266] e incluso SFE [267,268] o PLE [269], empleando disolventes orgánicos como acetona, AcN, MeOH y acetato de etilo [262]. También se han descrito análisis multirresiduo basados en la metodología QuEChERS para el análisis de pesticidas en alimentos infantiles de carne [270].

Dado que los procesos de extracción no son específicos, de nuevo, es necesaria la limpieza del extracto antes del análisis de las TRZs que se realiza, generalmente, mediante SPME [269] o SPE, empleando sorbentes polares (sílice, alúmina, Florisil), apolares (alquil-sílicas,  $C_8$  y  $C_{18}$ ), fases poliméricas (Oasis HLB, PS-DVB) o de intercambio iónico. También se ha descrito el uso de sorbentes selectivos tales como los soportes de afinidad o los MIPs [148,271]. Otras técnicas de limpieza descritas para este tipo de extractos se basan en el empleo de diálisis o separación con membrana [265].

La presencia de toxinas naturales de la familia de las **MCs** en matrices de origen animal también se ha descrito, aunque con menor frecuencia que en el caso de las FQs o las TRZs. Las muestras analizadas (i.e. tejido muscular, hígado y riñón) son generalmente muestras de molusco (e.g. caracoles acuáticos [272-274]), peces [272,275-280] (e.g. carpa, tilapia) o gambas [272,278,281] y, en ocasiones, patos, tortugas y aves acuáticas [276]. Los residuos de MCs aparecen como resultado de la exposición de estas especies animales a aguas contaminadas, pasando a formar parte de la cadena trófica, donde pueden causar problemas debido a su bioacumulación [273,279] como consecuencia de su elevada estabilidad. También se ha descrito la aparición de residuos de MCs y sus metabolitos en hígado de rata y ratón como consecuencia de la exposición de estos mamíferos a MCs [282].

Habitualmente, antes de proceder a la extracción de MCs en muestras de origen animal, éstas se someten a un proceso de liofilización [272-276,278,279,281]. La extracción se lleva a cabo empleando disoluciones acuosas (0.01 M EDTA, 5% ác. acético [272,275]; tampón TRIS-HCl 100 mM a pH 7.2 [282]), MeOH [274], mezclas hidro-orgánicas ácidas de alto contenido en MeOH [277,280], o mezclas trifásicas de butanol:MeOH:agua (1:4:15) [273,276,279,281], mediante procesos de UAE [272,273,275,277,280,283] o SLE con agitación [276,279,278,281]. A fin de eliminar componentes co-extraídos de la matriz, el extracto resultante se somete a una o varias etapas de limpieza empleando SPE de fase inversa (e.g. LiChrolut RP-18 [277,283], Sep-Pack ODS [276,278,279,281,282]) o fases poliméricas (Oasis HLB [273]). Ocasionalmente se ha descrito la aplicación del SPE en tándem [272,275], ciclos de desnaturalización (a 90 °C) y digestión (con proteasas) [282], etapas de desgrasado mediante LLE con hexano [280] o, incluso, la purificación de los extractos utilizando soportes de inmunoafinidad empleando anticuerpos selectivos a MCs [282].

Sin embargo, la principal fuente de exposición del hombre a este tipo de toxinas es el agua de consumo y, en menor medida, el contacto con aguas contaminadas durante actividades recreativas. Por todo ello, la presencia de MCs en aguas ha sido, con diferencia, mucho más estudiada que en otras matrices alimentarias.

Tabla 14. Métodos de tratamiento de muestra para la determinación de Qs y FQs en matrices de origen animal.

Compuestos determinados	Matriz	Tratamiento de muestra	Recuperación (%)	Técnica de determinación	LOD/LQD (CC <sub>α</sub> /CC <sub>β</sub> ) $\mu\text{g kg}^{-1}$ o $\mu\text{g L}^{-1}$	Ref
8 FQs	Músculo de cerdo	(1) MAE (0.3% HPO <sub>3</sub> :AcN, 75:25) (2) SPE (ENV + Isolute)	82 – 104	HPLC-UV	5-12/17-39	[232]
5 FQs	Leche	(1) Desproteínización (5% AcH en AcN) (2) Desgrasado (hexano) (3) SPE (C <sub>18</sub> )	85 – 101	LC-ESI-MS/MS	0.2/0.5	[242]
4 FQs	Leche	(1) Extracción y desproteínización (tampón McIlvane + EDTA) (2) SPE (Oasis-HLB)	71 – 91	CE-DAD	13-20/44-66	[284]
8 Qs	Leche	(1) Desgrasado (NH <sub>3</sub> ) (2) SPE-Tándem (Oasis MAX/ Oasis HLB)	81 – 110	CE-ESI-MS/MS	4-6/17-24	[218]
10 Qs	Músculo de pollo; huevo	(1) UAE (Músculo: MeOH + 0.1% TFA; Huevo: AcN + 0.75 M NaOH) (2) SPE (LiChrolut RP-18)	96 – 103	HPLC-UV	5-12/-- (15-405/15-407)	[231]
8 Qs	Músculo bovino; leche; acuicultura	(1) Leche: desproteínización (20% TCA en MeOH); Músculo y acuicultura: extracción (H <sub>2</sub> O) (2) SPE (Isolute C <sub>18</sub> )	80 – 110	HPLC-ESI-MS <sup>2</sup>	(36-412/ 41-505)	[241]
8 Qs	Leche	MSPD (Cristobalita)	93 – 110	HPLC-ESI-MS/MS	--/0.3-1.5	[254]

Tabla 14. Continuación.

Compuestos determinados	Matriz	Tratamiento de muestra	Recuperación (%)	Técnica de determinación	LOD/LQD (CC <sub>α</sub> /CC <sub>β</sub> ) μg kg <sup>-1</sup> o μg L <sup>-1</sup>	Ref
5 FQs	Músculo de pavo	(1) UAE (0.4% HPO <sub>3</sub> :AcN, 70:30) (2) SPE (ENV + Isolute)	70 – 87	a) HPLC-UV b) HPLC-MS a) HPLC-MS/MS	a) 4-10/13-33 b) 0.4-2/2-6 c) 0.05-0.1/0.2-0.5	[226]
9 FQs	Carne	(1) UAE (H <sub>2</sub> O) (2) SPE (Oasis HLB)	30 – 55	HPLC-ESI-MS/MS	(2-443/2.4-485)	[239]
3 Qs	Salmón	(1) SLE (0.1% AcH en AcN + NaCl) (2) DSPE (Bondesil-NH <sub>2</sub> )	40 – 100	HPLC-TOF-MS	2-2.5/6-9 (103-217/107-234)	[211]
3 FQs*	Músculo de cerdo	MSPD (C <sub>18</sub> )	60 – 108	HPLC-DAD	2.5-5/9-17	[230]
7 FQs	Músculo, hígado y riñón bovino	MSPD (Cristobalita)	84 – 102	HPLC-ESI-MS/MS	2-9/3-23	[224]
7 Qs	Huevo	MSPD (Cristobalita)	89 – 103	HPLC-ESI-MS/MS	0.1-0.6/0.2-0.6 (0.4-2.6/0.6-3.7)	[253]
5 Qs	Músculo y riñón bovino; huevo	(1) UAE (HCl 1M) (2) SPE (C <sub>18</sub> )	64 – 100	HPLC-DAD	1-4/--	[219]
3 FQs	Huevo	Extracción y desproteínización (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + AcN)	82 – 108	HPLC-FLD	1-3/--	[220]

2 FQs	Huevo	Diálisis (diclorometano)	55 – 104	HPLC-ESI-MS	2-4/2-4	[221]
7 FQs	Huevo	(1) LLE (MeOH) (2) Desgrasado (hexano:diel éter:NaCl)	60 – 100	HPLC-FLD-MS <sup>3</sup>	--/0.1-7	[222]
4 FQs	Huevo	(1) SFE: (a) Desgrasado (CO <sub>2</sub> ), (b) extracción (CO <sub>2</sub> :MeOH, 80:20, v/v)	83 – 96	HPLC-FLD	10/--	[223]
5 FQs	Músculo; huevo	MSPD (MIP)	85 – 105	HPLC-FLD	0.05-0.09/--	[229]
2 FQs	Pollo	MSPD (MIP)	83 – 102	HPLC-DAD	8-9/--	[251]
2 FQs	Tejido animal	(1) Extracción (AcN:H <sub>2</sub> O, 1:1 (v/v) + 0.1mL L <sup>-1</sup> ácido fórmico) (2) TFC (HTLC™ Cyclone u Oasis HLB)	72 – 105	HPLC-ESI-MS	--/25	[255]
9 Qs	Alimentos infantiles	(1) UAE (MeOH) (2) SPE (a. MIP; b. SAX)	86 – 105	HPLC-UV	a. 9-45/30-130 b. 30-110/100-350	[249]
22 Qs	Leche	(1) UAE (Tampón McIlvaine) (2) SPE (Blond Elut Plexa)	52 – 95	UPLC-MS/MS	0.002-0.409/0.008-0.339	[285]
12 Qs*	Músculo de pollo	(1) QuEChERS (2) SPE	37 – 95	HPLC-ESI-MS/MS	(6.59-444/11.2-487)	[259]
4 Qs	Pescado	(1) QuEChERS (2) DSPE	73 – 96	HPLC-DAD	--	[260]
13 Qs	Pienso	(1) PLE (0.2% HPO <sub>3</sub> :AcN, 70:30) (2) SPE (Oasis HLB)	44 – 103	HPLC-DAD HPLC-FLD	400-1300/--	[237]

Tabla 14. Continuación.

Compuestos determinados	Matriz	Tratamiento de muestra	Recuperación (%)	Técnica de determinación	LOD/LQD (CC <sub>0</sub> /CC <sub>β</sub> ) μg kg <sup>-1</sup> o μg L <sup>-1</sup>	Ref
11 Qs	Riñón de oveja	SLE (PBS)	--	ELISA	2-6/--	[286]
6 FQs	Pechuga de pollo	MAE (1) extracción 0.3% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> en AcN:H <sub>2</sub> O pH 3 (70:30, v/v) (b) limpieza (hexano)	66 – 97	HPLC-MS/MS	2.7-6.7/--	[233]
5 FQs	Piensos	(1) MAE (tampón McIlvaine, EDTA 0.1 M, pH 4.0) (2) SPE (Oasis HLB)	62 – 98	HPLC-ESI-MS/MS	5.0-9.1/16.5-30	[234]
5 FQs	Alimentos infantiles	PLE (AcN: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 50mM, pH 3.0 (80:20, v/v))	69 – 107	HPLC-FLD	--/12-29 (10-19/17-32)	[236]
15 FQs	Músculo, hígado y riñón porcino y bovino; músculo e hígado pollo; pescado	(1) PLE (AcN) (2) SPE (Oasis HLB)	76 – 90	HPLC-MS/MS	3/10	[238]
11 Qs	Riñón de cerdo	(1) LLE (AcN) (2) SPE (SDB-RPS)	99 – 105	HPLC-ESI-MS/MS	0.3-2.1/1-7	[244]

15 FQs	Riñón de cerdo; productos marinos; músculo de pollo; huevo	1) Extracción (AcN:PBS, 1:1 (v/v))	--	ELISA	(0.3-0.7/4-200)	[287]
FLU	Músculo de pollo	SLE (HBS-EP, carboximetil dextrán sódico 5 g L <sup>-1</sup> , NaCl 0.3 M, 0.05% Tween 80)	66 – 75	Inmunosensor óptico (SPR)	(500/600)	[288]
5 FQs	Gambas	SLE (1% ácido acético en EtOH)	70	ELISA	1-8/--	[289]
2 FQs	Leche	Centrifugación y dilución 1:20	--	ELISA	0.38/--	[290]
10 FQs*	Leche	Dilución 1:5 con PBS	--	Inmunosensor óptico	1.3-34.2/--	[291]

\*Determinación multirresiduo. AcH: ácido acético; AcN: acetonitrilo; CC<sub>50</sub>: límite de decisión; CC<sub>50</sub>: capacidad de detección; CE: electroforesis capilar; DAD: detector de hilera de diodos; DSPE: extracción en fase sólida dispersiva; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; ELISA: inmunoensayo enzimático en fase heterogénea; ESI: ionización por electrospray; EtOH: etanol; FLD: detector de fluorescencia; FLU: flumequina; FQs: fluoroquinolonas; HBS-EP: HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3.4 mM, 0.005% Surfactante P20; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; LC: cromatografía líquida; LLE: extracción líquido-líquido; LOD: límite de detección; LQD: límite de cuantificación; MAE: extracción asistida con microondas; MeOH: metanol; MIP: polímero de impronta molecular; MS: espectrometría de masas; MSPD: dispersión de matriz en fase sólida; PBS: tampón fosfato salino; PLE: extracción con solventes presurizados; Qs: quinolonas; QuEChERS: (del inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*); SAX: cartuchos de intercambio aniónico; SDB-RPS: copolímero poliestireno divinilbenzeno modificado con grupos ácido sulfónico; SFE: extracción con fluidos supercríticos; SLE: extracción sólido-líquido; SPE: extracción en fase sólida; SPR: resonancia de plasmones superficiales; TCA: ácido tricloroacético; TFA: ácido trifluoroacético; TFC: cromatografía de flujo turbulento; TOF: tiempo de vuelo; UAE: extracción asistida por radiación de ultrasonidos; UV: detector de ultravioleta.



### 2.3.1.3. Muestras de origen vegetal.

En los últimos años se han descrito distintos procesos de tratamiento de muestras de origen vegetal para el análisis de un gran número de compuestos, incluyendo herbicidas de la familia de las TRZs, antibióticos FQs y en algún caso, aunque mucho menos frecuentemente, de MCs.

Aunque los seres humanos pueden verse expuestos a residuos de TRZs a través de la ingesta de productos de origen animal, la principal ruta de exposición se presenta a través de alimentos de origen vegetal, procedentes de cultivos (*e.g.* maíz, nueces, frutas) que han sido tratados con este tipo de herbicidas. Es por ello que la presencia de estos compuestos en este tipo de matrices ha sido ampliamente estudiada.

La extracción de TRZs de muestras de origen vegetal se lleva a cabo empleando disolventes orgánicos (acetona, AcN, acetato de etilo, MeOH, cloroformo, diclorometano), agua, disoluciones acuosas tamponadas o mezclas de disolventes [27,262]. Varios autores han descrito métodos basados en SLE con agitación o en extracción Soxhlet [292]. Sin embargo, estos procedimientos requieren emplear tiempos de extracción largos y grandes volúmenes de disolvente para lograr que el proceso sea cuantitativo, por lo que están siendo sustituidos por métodos más eficientes basados en el empleo de UAE [293,294], MAE [295,296], SFE [296–299] o PLE [300].

Al igual que se ha descrito anteriormente para las muestras de origen animal, tras la etapa de extracción es necesaria una etapa de limpieza y preconcentración del extracto empleando, generalmente, SPE. Se ha descrito el uso de sorbentes  $C_{18}$ , intercambio iónico o base polimérica (PS-DVB) para la limpieza de extractos procedentes de muestras de frutas, verduras, cereales y otros vegetales [301,302], en ocasiones aplicados en tándem [297]. Alternativamente se han empleado, para la limpieza de estos extractos, sorbentes selectivos como los inmunosorbentes [298] o los MIPs. Por ejemplo, se ha descrito la aplicación de los MIPs para la extracción de TRZs en muestras de zumo de uva [303] y en extractos de maíz [151], lechuga [304], patata [305] y manzana [306], entre otros. Otras técnicas, como la SBSE, también se han aplicado al análisis de estos herbicidas en muestras de origen vegetal [307].

La tendencia actual a utilizar métodos de extracción simples, de bajo coste y que permitan alcanzar factores de preconcentración elevados, reduciendo el volumen de disolvente empleado durante el proceso, ha favorecido la aplicación de técnicas tales como la extracción DLLME [175,308], o la extracción MSPD, empleando sorbentes de distinta naturaleza (Bondesil-NH<sub>2</sub> [309], Florisil o  $C_{18}$  [27]), para la extracción de TRZs en muestras vegetales con buenos resultados. Recientemente se ha descrito el empleo

de MSPD combinada con ultrasonidos (UA-MSPD, del inglés *ultrasonic-assisted matrix solid-phase dispersion*) para la extracción de pesticidas triazínicos y organofosforados de frutas (manzana, pera y melocotón), observándose un incremento en la eficacia del proceso [310].

La presencia de **FQs** no se observa con frecuencia en muestras de origen vegetal, aunque se ha descrito el análisis de antibióticos de esta familia en productos de apicultura [311], principalmente en muestras de miel [312,313]; en verduras [314] y otros vegetales [315]. En el caso de la miel, la muestras se analizan directamente [312], o tras su preconcentración empleando TFC [312] o SPE [316]. Las verduras y plantas se tratan de forma similar a cuando se analizan **Qs** en muestras de origen animal. Así, se ha descrito el uso de UAE [315], o extracción QuEChERS [311], seguido de un proceso de limpieza y/o preconcentración SPE, con cartuchos de base polimérica (Oasis HLB [315]) o  $C_{18}$  [317].

La exposición del ser humano a **MCs** a partir de productos de origen vegetal no es habitual, por lo que existen muy pocos trabajos que investigan su presencia en este tipo de matrices. Solo se han descrito el análisis de estas cianotoxinas en suplementos alimenticios basados en algas [156,318,319]. En estos trabajos, las muestras se extraen con mezclas hidro-orgánicas con un 75% de MeOH o con bicarbonato de amonio 0.1 M, mediante SLE con agitación. Posteriormente se centrifugan, tras lo cual el sobrenadante se analiza directamente o tras una etapa de limpieza.

#### 2.3.1.4. Suelos, fangos y sedimentos.

De las familias de contaminantes estudiadas en la presente Tesis, las **TRZs** son las que se encuentran más habitualmente en muestras de suelos, dado que es donde se aplican. La movilidad de estos compuestos en el medioambiente suele ser baja y depende de factores tales como la frecuencia e intensidad de las lluvias, topografía del terreno y las características del suelo, ya que se fijan en las arcillas y se adsorben con facilidad en la materia orgánica [320]. De esta forma, una fracción importante de las TRZs aplicadas en los cultivos permanece en los suelos [321] días e incluso años, siendo necesario disponer de métodos de análisis que permitan su detección y la de sus metabolitos en este tipo de muestras. Los métodos más utilizados para la extracción de las TRZs de muestras de suelos son la SLE con agitación, la extracción Soxhlet, la UAE y la MAE [27].

El empleo del Soxhlet elimina la necesidad de filtrar el extracto y puede mejorar el rendimiento de la extracción respecto al método SLE clásico, dado que la solubilidad de las TRZs aumenta considerablemente con la temperatura del disolvente de extracción, siempre que esto no conduzca a la descomposición de los analitos [322]. Sin

embargo, el volumen de disolvente consumido es generalmente elevado. Una alternativa para prevenir la posible descomposición de los analitos al elevar la temperatura es el empleo de UAE [323,324]. En cualquiera de los dos casos (Soxhlet y UAE), los tiempos de extracción son largos y suelen requerir de una etapa posterior de limpieza, al producirse la co-extracción de numerosos componentes de la matriz.

Las técnicas de extracción MAE [325] y PLE [148] también han dado buenos resultados en este tipo de muestras y evitan, en muchos casos, la etapa de limpieza del extracto, al reducirse los componentes co-extraídos de la matriz.

Otra técnica empleada en la extracción de TRZs de suelos y sedimentos es la SFE [326]. En este caso la optimización del proceso es más compleja ya que, tanto la presión como la temperatura y los modificadores del disolvente de extracción ( $\text{CO}_2$ ) afectan críticamente a la eficacia del proceso y, aunque los resultados obtenidos para las TRZs son buenos, la recuperación de sus metabolitos, en ocasiones, no resulta fácil. Además, otro factor a tener en cuenta es que las TRZs pueden degradarse durante la extracción SFE [327].

La metodología QuEChERS aplicada a la extracción de TRZs de muestras de suelo también ha mostrado buenos resultados [328]. Recientemente se ha descrito el uso de agua caliente como disolvente, empleando la técnica de extracción PLE (PLEHW o PHWE, del inglés *pressurized hot water extraction*), para la extracción de TRZs en muestras de suelos [329]. Comparando este tipo de extracción con la metodología Soxhlet, la extracción PHWE permite acortar hasta 10 veces el tiempo de extracción, reduciendo a un 2% el consumo de disolvente orgánico y mejorando la precisión del proceso [327,330], ya que se reduce de forma notable la co-extracción de componentes no polares de la matriz [322]. Esta metodología cuenta con la ventaja adicional de poder acoplarse en línea con la técnica de análisis, reduciendo considerablemente la manipulación de la muestra [331].

Aunque en algunos casos el análisis se realiza sin necesidad de una etapa de limpieza [299], los extractos obtenidos deben ser, por lo general, filtrados y/o sometidos a etapas de *clean-up*. La limpieza de los extractos por LLE ha sido sustituida, prácticamente por completo, por procesos de SPE, empleando fases de distinta naturaleza: alúmina [324], fases alquil-sílicas ( $\text{C}_8$  y  $\text{C}_{18}$ ) [332], fases poliméricas [325], columnas de intercambio iónico [333] o MIPs [210,303,305], entre otras. Otra técnica aplicada en la preconcentración y limpieza de extractos de muestras de suelos y sedimentos para el análisis de TRZs es la SBSE [307,334].

Aunque la presencia de antibióticos de la familia de las **FQs** en muestras de suelo es menos frecuente, se ha descrito su aparición como consecuencia, por ejemplo, de la

bioacumulación de residuos ganaderos empleados como fertilizantes en tierras agrícolas [335-337]. Los procesos de tratamiento de muestra descritos en la literatura para el análisis de este tipo de matrices se basan en el uso de disolventes orgánicos polares, incluyendo mezclas de disolventes y disoluciones acuosas. El empleo de mezclas de extracción a pH extremo mejora el rendimiento del proceso y, aunque algunos autores describen mayores recuperaciones a pH ácido [338], otros observan mejores resultados a pH básico [339]. El proceso de extracción se lleva a cabo mediante SLE con agitación [340], extracción MAE [341,342], UAE [339,343] o PLE [338,344] y los extractos obtenidos se limpian mediante SPE empleando fases poliméricas, cartuchos de intercambio iónico o adsorbentes selectivos (*i.e.* MIPs [345]), entre otros.

Si bien es posible encontrar estudios de la adsorción y persistencia de MCs en muestras de suelos [346,347], esta familia de toxinas no suele analizarse en este tipo de matriz.

### 2.3.2. Métodos de análisis cromatográficos.

Las técnicas cromatográficas, en sus distintas modalidades, son la base de la mayoría de los métodos aplicados para la determinación de contaminantes en general.

#### 2.3.2.1. Cromatografía líquida.

La cromatografía líquida de alta resolución, en particular en fase inversa (RP-HPLC, del inglés *reversed-phase high-performance liquid chromatography*), ha sido la técnica más utilizada en las últimas décadas para el análisis de una gran variedad de compuestos, incluyendo residuos de medicamentos, pesticidas y toxinas naturales.

La separación cromatográfica mediante RP-HPLC de los contaminantes estudiados en el presente trabajo de Tesis (FQs, TRZs y MCs) se lleva a cabo, generalmente, empleando columnas basadas en soportes de sílice, destacando las fases C<sub>18</sub> y C<sub>8</sub> y, en algunos casos, fenol [348] o amida [23,349].

La optimización de la separación cromatográfica, a fin de obtener una buena resolución en un tiempo de análisis razonable, además de la selección de la fase estacionaria, incluye varios parámetros como son el pH, naturaleza y concentración de la fase móvil, o el uso de reactivos para la formación de pares iónicos [350]. Las fases móviles empleadas suelen consistir en mezclas binarias de AcN o MeOH con disoluciones acuosas. La selección del contenido de disolvente orgánico (modificador) en la fase móvil es un parámetro fundamental que debe ser investigado en cada caso. Lo más habitual es el empleo de fases binarias de AcN:agua, tanto en modo isocrático

como en modo gradiente, con un contenido de disolvente orgánico del 10 – 50%. La separación de FQs mediante RP-HPLC también se ha descrito utilizando fases ternarias AcN:MeOH:agua, AcN:tetrahidrofurano:agua o AcN:dimetilformamida:agua.

Dado que los compuestos estudiados presentan propiedades ácido-base, el pH de la fase móvil afecta significativamente a su separación. Las FQs son compuestos de carácter anfotérico (Figura 2), por lo que existen en disolución en forma catiónica, zwitteriónica y/o aniónica, en equilibrio. La forma zwitteriónica se retiene preferentemente en columnas de fase inversa, por lo que el pH de la fase móvil se mantiene entre 2 y 4 empleando tampones de distinta naturaleza, *e.g.* tampón fosfato (PB) en sus diferentes formas, el más empleado, o los tampones formiato, citrato y trifluoroacetato. Según algunos autores, el empleo del tampón citrato facilita la separación cromatográfica de las FQs con mayor resolución que el PB, debido a la mayor capacidad amortiguadora del primero a bajo pH [351,352]. No obstante, otros autores no han encontrado diferencias entre ellos [353]. La separación de MCs mediante RP-HPLC empleando fases binarias AcN:agua se ha descrito tanto a pH neutro [354] (empleando acetato de amonio) como a pH ácido [355,356] (0.05 – 0.1% TFA, que además de acidificar forma un par iónico), aunque el empleo de fases móviles a pHs ácidos suele conducir a separaciones de mayor resolución [46], dado que estas toxinas presentan carga neta negativa a valores de pH > 2.2 y menor carácter hidrofóbico cuanto mayor es el pH [357,358]. Respecto a las TRZs, compuestos con carácter débilmente básico, la separación LC suele llevarse a cabo a pH 6 – 7 [27].

La mayoría de las fases estacionarias empleadas en RP-HPLC se obtienen a partir de partículas de gel de sílice ligadas covalentemente a cadenas carbonadas. Sin embargo, parte de los grupos silanol (Si-OH) de la sílice permanecen sin modificar tras la funcionalización y pueden interaccionar con grupos básicos (*e.g.* restos amino de las FQs y TRZs), mediante interacción electrostática y/o por enlaces de hidrógeno, originando la aparición de colas, con el consiguiente ensanchamiento del pico y pérdida de la resolución cromatográfica [359]. Esto puede evitarse modificando el pH de la fase móvil o mediante la adición, en la composición de la misma, de especies formadoras de pares iónicos. Un ejemplo es el uso de alquilsulfatos o alquilsulfonatos de sodio, por ejemplo el dodecilsulfato sódico (SDS), que se ha empleado para la separación cromatográfica de FQs [23]. Estos compuestos presentan en su estructura una región hidrofóbica y una cabeza polar con un grupo sulfonato cargado negativamente. Mientras que la región hidrofóbica interacciona con la fase estacionaria, la cabeza polar interacciona electrostáticamente con los grupos amino de las FQs, formando pares iónicos, y mejorando la retención [351,360,361]. Otra aproximación es el empleo de aditivos aminados, generalmente trietilamina o sales de tetrabutilamonio, los

cuales van a competir con el analito por los grupos silanoles disponibles, reduciendo la probabilidad de interacción con los mismos [353,362]. No obstante, la adición de aminas aumenta la sensibilidad de la separación variaciones de la temperatura y favorece la aparición de deriva de la línea base, además de ser incompatible con la detección mediante espectrometría de masas [350]. Eso ha conducido al desarrollo de fases estacionarias con silanoles desactivados (*end-capped*), obtenidas a partir de sílice de elevada pureza, libre de trazas metálicas, y de fases estacionarias poliméricas que mejoran la resolución de la separación cromatográfica.

El empleo de fases estacionarias de menor tamaño de partícula ( $< 2 \mu\text{m}$ ) ha dado lugar a la cromatografía líquida de ultra-resolución (UPLC, del inglés *ultra-performance liquid chromatography*), que permite reducir el tiempo de análisis así como mejorar la resolución de la separación cromatográfica, aumentando la sensibilidad del análisis. La UPLC se ha aplicado al análisis de FQs [285,311], MC [363,364] y pesticidas, incluyendo herbicidas de la familia de las TRZs [365-367].

La detección y cuantificación de FQs se realiza empleando tres tipos de detección: espectroscopía ultravioleta, de onda fija (UV) o variable (DAD, del inglés *diode-array detector*), fluorescencia (FLD, del inglés *fluorescence light detector*) y espectrometría de masas (MS, del inglés *mass spectrometry*). Respecto a las TRZs y MCs, el análisis mediante HPLC suele realizarse empleando detectores DAD o MS.

Las FQs presentan dos bandas de absorción típicas entre 245 - 290 y 300 - 350 nm. Las MCs presentan una fuerte absorción a 238 nm debido a la presencia del grupo ADDA. Además, las variantes de MC que contienen triptófano en su estructura presentan otro máximo localizado a 222 nm [356]. Las TRZs se detectan, generalmente, en el intervalo de 220 - 230 nm, cuando se emplean los detectores UV. Aunque el uso de detectores DAD para el análisis de estas familias de contaminantes es habitual, su empleo requiere disponer de patrones que, en el caso de las MCs, son difíciles de obtener. Además, la identificación de los contaminantes no puede realizarse a partir del espectro de los mismos ya que puede verse afectado por la matriz de la muestra, y estos detectores presentan en general baja sensibilidad y selectividad, por lo que cada vez es más habitual la detección por MS.

La detección FLD es más específica y sensible que la detección DAD. Para la detección de FQs por FLD, la  $\lambda_{\text{exc}}$  se fija entre 275 y 280 nm y la  $\lambda_{\text{em}}$  entre 440 y 450 nm, dependiendo del compuesto estudiado. La intensidad de emisión de fluorescencia depende del pH de la disolución. El rendimiento cuántico de la emisión de fluorescencia en el caso de las FQs aumenta a pH ácidos, por lo que la optimización del pH de la fase móvil (generalmente entre 2-4) no solo mejora la separación

cromatográfica, sino que puede aumentar la señal de respuesta de los analitos, incrementando la sensibilidad del método [348]. Los detectores FLD se han empleado, ocasionalmente, en el desarrollo de métodos de análisis de TRZs [368]. Sin embargo, su uso no es habitual, ni para el análisis de TRZs ni de MCs, ya que estas familias de compuestos no presentan ningún grupo fluoróforo y es necesario generar previamente derivados fluorescentes.

El empleo de detección MS es cada vez más habitual para el análisis de una gran variedad de compuestos, debido a que se trata de un sistema de detección muy sensible y selectivo que, además, puede ser empleado en el desarrollo de métodos de confirmación al proporcionar información estructural de los compuestos detectados. El análisis de FQs, TRZs y MCs con detección MS se lleva a cabo, generalmente, empleando espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con ionización por electrospray (ESI, del inglés *electrospray ionization*) en modo positivo, debido a la presencia, en su estructura química, de grupos amino y/o cetona fácilmente protonables. En dichos análisis se identifica, generalmente, el ión pseudomolecular  $[M+H]^+$  y, en el caso de las MCs, el ión divalente  $[M+H]^{2+}$ . En el análisis de FQs, es habitual la identificación adicional de los fragmentos obtenidos en la disociación inducida por colisión de los iones precursores, típicamente pérdida de  $CO_2$  en el grupo carboxílico de la molécula,  $[MH - CO_2]^+$ , y pérdida de agua,  $[MH - H_2O]^+$ . Respecto a las MCs, un fragmento característico es el  $m/z$  135, proveniente de la ruptura del grupo ADDA. También se ha descrito el empleo de ionización química a presión atmosférica (APCI, del inglés *atmospheric-pressure chemical ionization*) para la detección de FQs [162] o TRZs [369]. El empleo de LC-MS/MS ofrece, además, la posibilidad de analizar un amplio número de residuos de distintas familias de modo simultáneo, dando lugar al desarrollo de métodos multirresiduo o multiclase. Una de las limitaciones del empleo de detección mediante MS es, sin embargo, la alta susceptibilidad al efecto matriz de esta técnica, que puede traducirse tanto en supresión como aumento de la señal de los analitos de interés, afectando a la sensibilidad y exactitud del método.

#### **2.3.2.2. Cromatografía de gases.**

La GC ha sido tradicionalmente una técnica de separación muy utilizada para el análisis de TRZs, ya que permite la separación eficaz de esta familia de compuestos. Dada la baja volatilidad de las TRZs, debido a la presencia en su estructura de grupos amino y/o hidroxilo, la separación mediante GC puede requerir una derivatización previa, que suele realizarse mediante una reacción de metilación de los grupos amino con diazometano [370,371].

Entre los detectores empleados en GC para la determinación de TRZs, los más utilizados son los detectores MS [174,183,372-374] y el detector de nitrógeno-fósforo (NPD, del inglés *nitrogen-phosphorus detector*), también conocido como detector termoiónico (TID, del inglés *thermoionic ionization detector*) [165,375,376]. Además de estos, se ha descrito el uso de detectores de captura electrónica (ECD, del inglés *electron capture detector*) [324] y detectores de ionización de llama (FID, del inglés *flame ionization detector*) [377-379].

Actualmente se tiende a acoplar el proceso de limpieza y preconcentración de las muestras con la determinación, empleando procesos *on-line* que permitan disminuir el tiempo de análisis y reducir la manipulación de la muestra. En este sentido, el empleo de la técnica de extracción SPME acoplada a GC es cada vez más habitual cuando se quieren analizar TRZs ya que las fibras de SPME permiten la desorción térmica de los analitos directamente en el inyector del cromatógrafo. Esta desorción se realiza a temperaturas comprendidas entre 240 y 280 °C durante intervalos de tiempo de 2 - 5 min [164,167].

Debido a que las FQs son compuestos polares, su análisis por GC solo puede realizarse previa derivatización, por lo que esta técnica se ha empleado en escasas ocasiones para su determinación [380].

Tampoco es habitual su aplicación para el análisis de MCs. Los métodos de determinación de MCs empleando GC se basan, generalmente, en el análisis cuantitativo del ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutírico (MMPB, del inglés *2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid*) obtenido en la oxidación del grupo ADDA con ozono, permanganato o periodato. El MMPB puede detectarse empleando GC-FID [381] o GC-CI-MS [382]. Sin embargo, estos métodos de análisis suelen implicar procedimientos largos y solo permiten determinar el contenido total de MCs, sin distinguir entre las variantes presentes en la muestra, por lo que su utilidad se limita al análisis de muestras complejas en las que la extracción de las toxinas resulta difícil [383].

### 2.3.2.3. Cromatografía de capa fina.

La cromatografía de capa fina (TLC, del inglés *thin-layer chromatography*) es una técnica de bajo coste que no requiere disponer de gran experiencia ni de un equipo especializado, permitiendo el análisis simultáneo de un gran número de muestras, por lo que resulta útil cuando se realizan separaciones de baja resolución. La introducción de sistemas de alta resolución (HPTLC, del inglés *high-performance thin-layer chromatography*) ha mejorado la eficiencia y reproducibilidad de las separaciones, disminuyendo los límites de detección alcanzados. Sin embargo, aunque se ha aplicado



al análisis de pesticidas, incluyendo TRZs, en muestras de agua [384-386] o extractos de suelos [387,388] y vegetales [389], al análisis de MCs en aguas [390,391] o para determinar FQs en agua [392], muestras de orina [393] y leche [394], extractos de músculo de cerdo [395] o preparados farmacéuticos [396], esta técnica no suele aplicarse en el desarrollo de métodos de análisis de rutina.

### **2.3.3. Métodos de análisis no cromatográficos.**

En la bibliografía pueden encontrarse métodos de análisis de residuos de FQs, MCs o TRZs basados en métodos de análisis no cromatográficos, algunos de los cuales se describen a continuación.

#### **2.3.3.1. Electroforesis capilar.**

Una alternativa al empleo de métodos cromatográficos para la separación de contaminantes es la electroforesis capilar (CE, del inglés *capillary electrophoresis*), que permite la separación rápida de un gran número de compuestos.

Uno de los campos de mayor aplicación de la CE es el análisis de medicamentos, incluyendo los antibióticos [397]. El análisis de FQs mediante CE se lleva a cabo, generalmente, empleando la modalidad de electroforesis capilar en zona (CZE), aunque también se ha descrito el empleo de las modalidades de cromatografía micelar electrocinética (MEKC, del inglés *micellar electrokinetic chromatography*) o de electroforesis capilar en medio no acuoso (NACE, del inglés *non aqueous capillary electrophoresis*) [397]. Acoplada con detección UV, se ha empleado para la determinación de Qs en tejidos de pollo [398-400] y cerdo [401,402] o en muestras de leche [284]. Con el objetivo aumentar la sensibilidad del análisis, se han empleado técnicas de preconcentración *on-line* [403] y/o se ha sustituido la detección UV por detectores amperométricos [404], electroquimioluminiscentes [405], FLD [406] y MS [218,407,408]. También se ha descrito el análisis multirresiduo o multiclase de antibióticos empleando CE-MS/MS [409].

La CE está adquiriendo importancia como método para el análisis de TRZs en muestras medioambientales. Se ha aplicado al análisis de estos herbicidas y sus metabolitos en muestras de aguas subterráneas [410] y superficiales [411,412] o en muestras de suelos [151], y su acoplamiento con procedimientos de SPE *on-line* se ha descrito como estrategia de cara a mejorar la sensibilidad del ensayo [413]. Generalmente, el uso de CE para el análisis de TRZs se lleva a cabo empleando detectores UV aunque el uso de MS está en aumento debido a las ventajas que aporta, en términos de sensibilidad y selectividad [423], y a que permite el análisis multiclase de pesticidas [415]. Recientemente se ha descrito el desarrollo de un chip basado en CE

con detección amperométrica pulsada [416], que permite la separación y análisis de SIM, ATR y ametrina, tres de los herbicidas triazínicos más empleados.

La CE también se ha empleado en la separación de MCs, combinada con detección UV [142,417], FLD [418] y MS [419-421]. Sin embargo, su utilización para el análisis de este tipo de toxinas no es muy habitual ya que, en general, presenta una menor sensibilidad y es menos robusta que los métodos cromatográficos.

### 2.3.3.2. Métodos biológicos.

#### A) Ensayos con organismos vivos.

Un ejemplo de ensayos con organismos vivos lo constituyen los ensayos microbiológicos, métodos de análisis cualitativo o semi-cuantitativo, basados en una reacción específica entre un contaminante y un organismo susceptible al mismo, empleados como métodos de cribado (*screening*) para el análisis de un elevado número de muestras a bajo coste.

Las técnicas microbiológicas se han aplicado extensamente en el análisis de antibióticos empleando bacterias (*i.e.* *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Yersinia ruckeri*, *Bacillus stearothermophilus*, etc.) como organismos susceptibles. Son ensayos fiables, simples y de bajo coste, que no requieren un equipamiento sofisticado. La lectura de los resultados suele ser visual o fotométrica y, a diferencia de los métodos cromatográficos, que sólo detectan aquellos compuestos que han sido seleccionados como analitos objeto de estudio, los métodos microbiológicos permiten detectar cualquier antibiótico o metabolito con actividad antibacteriana presente en una muestra, mediante la inhibición del crecimiento bacteriano, cubriendo un amplio espectro de antibióticos en un único análisis. Sin embargo, no son específicos y, en muchos casos, requieren tiempos de incubación largos. Se han aplicado al análisis de FQs en muestras de carne de pollo y pescado [422-424], músculo bovino, ovino o porcino [425] o en muestras huevo [426] y leche [427,428]. En algunos casos, el límite de detección es superior al LMR establecido, siendo necesario el empleo de una segunda bacteria y/o segundo medio de crecimiento, en ensayos complementarios. Esta misma estrategia se emplea habitualmente en el desarrollo de los denominados ensayos STAR (del inglés *Screening Test for Antibiotic Residues*), métodos de *screening* para la detección de antibióticos de distintas familias, de forma simultánea, llevados a cabo en dos posibles formatos [429]: test multi-placa [430-435] o test en tubo [436-438].

Los ensayos con organismos vivos también se han aplicado como métodos de *screening* para el análisis de toxinas naturales. Un ejemplo son los bioensayos con

ratones, empleados hasta hace poco para la detección de MCs. Sin embargo, la falta de sensibilidad y especificidad del ensayo, junto con la creciente oposición de la opinión pública, por motivos éticos, respecto al uso de animales en ensayos de toxicidad, ha provocado que caigan en desuso. Hoy en día, estos estudios se realizan empleando organismos invertebrados. Aunque se ha investigado la respuesta de distintos invertebrados, incluyendo *Daphnia sp.*, *Drosophila melanogaster* y larvas de mosquito [439,440], ninguno ha sido validado para su uso como ensayo de rutina. Actualmente, el más empleado es *Artemia salina* [441]. Este ensayo es una alternativa a los bioensayos con ratones, sencilla y de bajo coste, en la que larvas de *Artemia salina* se ponen en contacto con distintas muestras en un medio de crecimiento adecuado, a 25 °C, midiendo la toxicidad tras 18 h de exposición. Sin embargo, los bioensayos con *Artemia salina*, al igual que los bioensayos con ratones, no son específicos y la respuesta puede verse afectada por distintos componentes de la muestra (efecto matriz) [383].

#### B) Ensayos bioquímicos.

Este tipo de ensayos emplea las propiedades bioquímicas de un contaminante como base para su monitorización. Un ejemplo son los ensayos para analizar MCs basados en la capacidad de estas toxinas de inhibir las enzimas PP [442]. El ensayo se ha llevado a cabo empleando tanto la proteína PP1 como la proteína PP2A, aunque la sensibilidad es mucho mayor empleando esta última. El ensayo consiste en medir el efecto inhibidor de las MCs presentes en la muestra sobre la liberación de fosfato a partir de sustratos proteicos fosforilados. Generalmente se cuantifica empleando sustratos marcados isotópicamente ( $^{32}\text{P}$ ) [443], sustratos cromogénicos (*p*-nitrofenol fosfato) [444,445] o sustratos fluorogénicos (4-metilumbeliferil fosfato y 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato) [446]. Estos ensayos permiten detectar concentraciones de MCs por debajo del valor guía establecido por la WHO en una gran variedad de matrices sin necesidad de etapas de preconcentración, por lo que los ensayos son rápidos. Sin embargo, la respuesta varía en función de las variantes de MCs presentes en la muestra, ya que la capacidad de inhibición de cada una es distinta, si bien hay que señalar que la relación existente entre la capacidad de inhibición y la toxicidad de la variante hace que la respuesta de este tipo de ensayos sea un indicador de la toxicidad global de la muestra. Además, este tipo de ensayo no permite distinguir las variantes presentes y su respuesta puede verse afectada por la presencia de otros componentes de la matriz que tengan la capacidad de inhibir la PP empleada.

#### C) Inmunoensayos.

Los inmunoensayos o técnicas inmunoquímicas son métodos de análisis basados en el empleo de Abs. Como se ha visto en el apartado 2.2.4, los Abs presentan en su

estructura sitios de reconocimiento selectivo a través de los cuales interaccionan con el Ag. Esta interacción Ag-Ab, altamente específica, se emplea para medir la concentración de un contaminante en una muestra dada.

Entre los métodos inmunoquímicos, los EIAs son los más empleados. Como se indicó anteriormente, este tipo de ensayos emplea enzimas como elemento generador de señal. Se distinguen dos tipos de inmunoensayos, en función de la forma en que se emplea el trazador enzimático. Si la enzima está covalentemente unida al Ab, el ensayo se denomina tipo ELISA (del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), mientras que el término EIA se emplea de forma general o cuando la enzima se conjuga a un análogo del compuesto que va a medirse. Dentro de los inconvenientes de los EIAs destaca la limitación de poder aplicarse sólo a la determinación de familias de contaminantes, ya que los Abs, en general, muestran reactividad cruzada frente a compuestos con estructura y distribución electrónica similar. Si bien esto podría minimizarse mediante la ejecución de ensayos en paralelo con Abs de distinta especificidad, para obtener un mayor conocimiento de la composición de la muestra, suelen realizarse como métodos de *screening*, cuantificado el contenido total de una familia de contaminantes, lo que es suficiente para descartar muestras negativas, no contaminadas. Las muestras positivas, con un contenido de contaminante mayor a un límite previamente establecido, se confirman posteriormente, si es pertinente, mediante un método de referencia generalmente cromatográfico.

Los EIAs se han aplicado al análisis de TRZs en distintos tipos de muestras como suelos [447-449], aguas subterráneas y superficiales [450,451] o alimentos (e.g. frutas, leche) [452-454]. También se han aplicado a la determinación de residuos de FQs en alimentos [287,289,455-457] y aguas [458] o al análisis de MCs en muestras de aguas [135,459-462]. El análisis de aguas se realiza normalmente sin pretratamiento de la muestra, mientras que el análisis de matrices más complejas, como suelos o alimentos, suele llevarse a cabo tras la extracción de los analitos con un disolvente orgánico o mezcla hidro-orgánica, y posterior filtración y/o dilución con tampón para reducir el contenido orgánico del extracto. Esta etapa supone un inconveniente para su aplicación como métodos de barrido. Aún así, se pueden encontrar kits comerciales para la determinación de TRZs en leche (Millipore) o en carnes (Strategic Diagnostics Inc.). Otros kits disponibles son los comercializados para el análisis de MCs en aguas por Strategic Diagnostics Inc., Wako Chemicals, Abraxis LLC y Enviroligix Inc., o los kits ELISA de Randox Laboratories, Beijing Kwinbon Biotechnology Co., Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology Co., Cosmo Bio Co. y Wanger Biotech para la determinación de residuos de FQs en alimentos.

Una variante de los ensayos ELISA son los inmunoensayo basados en filtración (inmunofiltración). Uno de los formatos más destacables de este tipo de ensayos es el denominado ELIFA (del inglés *Enzyme-Linked Immunoflow Assay* o *Enzyme-Linked Immunofiltration Assay*). En un ELIFA, las placas de poliestireno empleadas en el ensayo ELISA se sustituyen por membranas (nylon, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno, etc.), sobre las que se inmovilizan los inmunorreactivos (adsorción). Las disoluciones, tras cada etapa de incubación, se eliminan mediante filtración a vacío, lo que permite concentrar tanto reactivos como analitos y reducir el tiempo de análisis [463]. Otro formato de ensayo basado en inmunofiltración es el denominado DIGFA (del inglés *dot-immunogold filtration assay*), en el cual se emplea oro coloidal como marcador. La inmunofiltración es muy versátil y se ha usado para la determinación de TRZs en aguas [464,465] y matrices de origen vegetal [466] o FQs en muestras de origen animal [467,468].

A pesar de poder aplicarse al análisis directo o con mínimo pretratamiento de muestras, el empleo de los EIAs resulta largo y tedioso en muchas ocasiones ya que estos métodos requieren múltiples etapas de incubación y lavado. La automatización de estos ensayos empleando las técnicas de análisis por inyección, en flujo (FI, del inglés *Flow Injection*) o secuencial (SI, del inglés *Sequential Injection*), ha permitido acortar los tiempos de análisis y reducir los errores asociados con la manipulación de la muestra, dando lugar a los denominados inmunoensayos en flujo (FIIA, del inglés *Flow Injection Immunoassay*) [469,470]. Este tipo de ensayos permiten el análisis automático de un gran número de muestras de forma secuencial, presentando una sensibilidad y selectividad similares a las de otros inmunoensayos. Su aplicación se ha descrito para la determinación de TRZs en muestras acuosas [471-473], de maíz [474] y de suelo.

De desarrollo más reciente, pero muy utilizado, es el formato de inmunoensayo basado en tiras reactivas, también denominado inmunoensayo de flujo lateral, ensayo inmunocromatográfico o *dipstick* [475]. La primera aplicación de este formato de ensayo fue el test de embarazo, basado en la detección de gonadotropina coriónica humana (HGC, del inglés *human chorionic gonadotropin*) [476]. Desde entonces, han aparecido numerosos tests comerciales en tiras para la detección de hormonas, alérgenos, toxinas o drogas. El formato de ensayo en tiras reactivas es similar a los EIAs pero, en este caso, los reactivos se encuentran depositados en un soporte sólido (generalmente membrana de nitrocelulosa) y la presencia o ausencia del analito diana se determina mediante el flujo capilar de la muestra líquida (o extracto). La detección es generalmente visual, empleándose reactivos marcados en la mayoría de los casos con oro coloidal. Por tanto, se trata de métodos de *screening* (cualitativos o semicuantitativos) rápidos, de bajo coste, muy versátiles y fáciles de usar. Su empleo se ha descrito para detección de FQs en alimentos de origen animal, como músculo e hígado de pollo [477,478] o muestras de

leche [479,480]. También se han aplicado para la monitorización de herbicidas de la familia de las TRZs en muestras de origen vegetal [466,481] y aguas [482-485], así como en el análisis de MCs [486-489]. Sin embargo, este tipo de dispositivos son de un único uso, y los límites de detección son muy próximos o incluso superiores a los valores máximos establecidos para los contaminantes monitorizados.

A pesar de sus importantes ventajas, independientemente del formato en que se desarrollen, los ensayos inmunoquímicos no están exentos de limitaciones. Estos ensayos pueden estar afectados por el pH y los distintos componentes de muestra (ácidos húmicos, sales, etc.). Además, la respuesta del método está limitada por la selectividad del Ab, que puede reconocer compuestos análogos, metabolitos u otros componentes que puedan estar presentes en la muestra. Así pues, la reactividad cruzada y el efecto matriz son los dos factores importantes que hay que estudiar detenidamente, en cada caso, cuando se lleva a cabo el desarrollo y optimización de un inmunoensayo.

### 2.3.3.3. Biosensores.

El uso de sensores y biosensores químicos ofrece algunas ventajas muy atractivas frente al empleo de métodos cromatográficos, para el análisis de contaminantes, entre las que cabe destacar un menor coste por análisis y que, habitualmente, se trata de dispositivos fáciles de utilizar que no requieren de personal especializado para su manejo. Además, a diferencia de las técnicas de análisis convencionales, los sensores son, en general, sistemas fácilmente miniaturizables que pueden dar lugar a resultados cualitativos o semicuantitativos *in situ* (i.e. en la propia matriz de la muestra), reduciendo los costes asociados al transporte y almacenamiento de la misma en el laboratorio y permitiendo una toma de decisiones rápida cuando surge un problema. Es por ello que, en los últimos años, se ha prestado una especial atención a este tipo de dispositivos en distintas áreas, incluyendo el ámbito de la química analítica.

La sensibilidad y selectividad del sensor va a estar condicionada, entre otros factores, por el elemento de reconocimiento empleado. En general, los sensores desarrollados para la determinación de contaminantes en alimentos y medioambiente se basan en el empleo de elementos de reconocimiento de origen biológico, también conocidos como biosensores.

Los Abs son los elementos de reconocimiento biológico más empleados en el desarrollo de biosensores para el análisis de los contaminantes estudiados en la presente Tesis, dando lugar a un amplio grupo de dispositivos, denominados inmunosensores. En la Tabla 15 se resumen las características de algunos de los inmunosensores descritos en la bibliografía para la determinación de TRZs, MCs y Qs.

También se han descrito biosensores catalíticos basados en el empleo de enzimas, tejidos o células como receptores. Aunque en ocasiones este tipo de dispositivos permite, únicamente, el análisis semi-cuantitativo del contenido de contaminante en la muestra, algunos de ellos ofrecen la posibilidad de medir efectos biológicos (e.g. la toxicidad) que pueden resultar más significativos que la propia composición de la muestra.

Para el desarrollo de biosensores catalíticos, el elemento de reconocimiento más utilizado son las enzimas (biosensores enzimáticos). Un ejemplo son los sensores para la determinación de TRZs, basados en el efecto inhibidor que ejercen estos herbicidas sobre la enzima tirosinasa, empleando como sustratos enzimáticos catecol o fenol [490-493]. El sistema redox catecol/*o*-benzoquinona, catalizado mediante HRP (del inglés *horseradish peroxidase*) o tirosinasa, también se ha empleado como sistema mediador para la determinación de FQs en muestras de suero sanguíneo [494] o productos farmacéuticos [495,496] ya que, en presencia de piperazin-quinolonas, la *o*-benzoquinona forma derivados de tipo aminoquinona por adición de Michael al grupo piperazina, interrumpiéndose el ciclo redox. Por otro lado, se han descrito biosensores enzimáticos para la determinación de MCs basados en la capacidad inhibitoria de estas cianotoxinas sobre la PP2A [497].

Como alternativa a las enzimas, se ha evaluado el uso de bacterias *E. coli* para la determinación Qs y otros agentes capaces de generar daño oxidativo a nivel de DNA [498,499]. Existen también biosensores para el análisis de TRZs basados en la inhibición del proceso fotosintético, empleando tanto orgánulos celulares [500-502] como células completas [503], y biosensores basados en la decoloración del herbicida (catalizada por la enzima atrazina-clorohidrolasa), empleando bacterias *Pseudomonas sp.* o *Clavibacter michiganese sp.* [504]. El empleo de células y tejidos presenta ventajas respecto al uso de enzimas o Abs, asociadas a su mayor estabilidad y menor coste de obtención. Sin embargo, suelen presentar baja sensibilidad, respuesta lenta y selectividad limitada, por lo que su empleo es mucho menos común.

El uso de elementos de reconocimiento biológicos, si bien proporciona buenos resultados, puede presentar problemas de estabilidad y, en ocasiones, los procedimientos para su obtención (aislamiento y purificación) son laboriosos. Es por ello que se han desarrollado elementos biomiméticos para su reemplazo entre los que se encuentran los MIPs, que se han aplicado al desarrollo de sensores selectivos a MCs [136], FQs [505] o TRZs [506-510].

Existen además otros elementos de reconocimiento no biológicos, utilizados en el desarrollo de sensores. Por ejemplo, el silicio poroso se ha empleado como elemento de

reconocimiento para el desarrollo de sensores ya que algunas de sus propiedades físicas (reflectividad, fotoluminiscencia, conductividad eléctrica, comportamiento como guía de onda) pueden variar al interaccionar con compuestos orgánicos (e.g. ATR) [511]. También se ha descrito el uso de Quantum Dots de ZnS dopados con Mn como elementos de reconocimiento para la monitorización de enoxacino (FQ de segunda generación) debido al efecto inhibitorio de este antibiótico sobre su emisión [512].

A pesar de los avances en el desarrollo de sensores para la determinación de contaminantes, los dispositivos descritos en bibliografía, si bien permiten el análisis secuencial de un gran número de muestras, en general no permiten su análisis simultáneo. Además, aunque se ha descrito el desarrollo de sensores ópticos para el análisis simultáneo de antibióticos de distintas familias en muestras de leche [513-515], o para el análisis simultáneo de pesticidas de distinta naturaleza [516-518], los sensores desarrollados para el análisis multiclase o multifamilia son todavía escasos, siendo estos dos factores, análisis multiclase y multimuestra, los que reciben una mayor atención en la actualidad.



Tabla 15. Resumen de las características analíticas de inmunosensores descritos en la bibliografía para la determinación de MCs, Qs y TRZs.

Compuestos determinados	Matriz	Pretratamiento de la muestra	Transductor	Figuras de mérito	Ref
Microcistinas					
MCLR, -YR, -RR	Agua de grifo y lago	No necesario	Óptico –TIRF	LOD: 0.03 µg L <sup>-1</sup> DR: 0.1 – 10.1 µg L <sup>-1</sup>	[137]
MCLR	Agua de lago; hígado y músculo de pescado	Agua: fil. (0.45 µm) Pescado: liofilización + SLE + SPE (Sep-Pack)	Óptico – SPR	LOD: ~ 1 µg L <sup>-1</sup> DR: 1 – 100 µg L <sup>-1</sup>	[519]
MCLR	Agua de río	Ajuste a fosfato 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, y BSA 0,1% + fil. (0.45 µm)	Óptico – CL	LOD: 0.2 µg L <sup>-1</sup>	[520]
MCLR	Agua de lago	No necesario	Óptico – UV-vis	LOD: 0.05 µg L <sup>-1</sup> DR: 0.1 – 10 µg L <sup>-1</sup>	[521]
MCLR	No aplicado a muestras reales	No necesario	Piezoeléctrico	LOD: 0.1 µg L <sup>-1</sup>	[522]
MCLR	Agua potable y de río	No necesario	Piezoeléctrico	LOD: 1 ng L <sup>-1</sup> DR: 10 <sup>-3</sup> – 100 µg L <sup>-1</sup>	[523]
MCLR, -YR, -LF, -LW, NOD	Agua potable y de río	Fil.	Electroquímico – Amperométrico	LOD: 0.5 µg L <sup>-1</sup>	[524]
MCLR	Agua potable	No necesario	Electroquímico – Capacitivo	LOD: 7.0 pg L <sup>-1</sup> DR: 10 <sup>-5</sup> – 1µg L <sup>-1</sup>	[525]

MCLR	Cultivo celular ( <i>M. aeruginosa</i> )	Liofilización + UAE + cent. + SPE (Sep-Pak)	Electroquímico – Voltamperométrico	LOD: 0.099 µg L <sup>-1</sup> DR: 0.227 – 50 µg L <sup>-1</sup>	[526]
MCLR	Cultivo celular	Liofilización + SLE + cent. + fil. (0.2 µm) + evaporación + dil.	Electroquímico – Amperométrico	IC <sub>50</sub> : 0.1 µg L <sup>-1</sup> DR: 10-4 – 100 µg L <sup>-1</sup>	[527]
MCLR	Agua de lago	SPE	RMN	LOD: 0.6 µg L <sup>-1</sup> DR: 1 – 18 µg L <sup>-1</sup>	[528]
Fluoroquinolonas					
FLU	Suero; músculo de pollo	Suero: dil. Músculo: SLE + cent.	Óptico – SPR	LOD: 15 µg L <sup>-1</sup> (suero); 24 µg kg <sup>-1</sup> (músculo)	[288]
13 Qs	Pescado; huevo; músculo de pollo	SLE/LLE + cent. + evaporación + desgrasado + cent.	Óptico – SPR	CC <sub>50</sub> : 0.13 – 0.31 µg kg <sup>-1</sup> IC <sub>50</sub> : 0.8 – 4.1 µg kg <sup>-1</sup>	[529-531]
CIPRO	Plasma sintético (NaCl 150 mM + 5% (w/v) BSA)	No necesario	Electroquímico – Impedimétrico	LOD: 10 ng L <sup>-1</sup>	[532]
NOR, GATI	Productos farmacéuticos; suero	Productos farmacéuticos: dis. + fil. Suero: desproteínización + dil.	Óptico – Luminiscencia	LOD: 0.06 – 0.96 µg L <sup>-1</sup> LOQ: 0.18 – 2.9 µg L <sup>-1</sup>	[533]
CIPRO	No aplicado a muestras reales	--	Electroquímico – Impedimétrico	DR: 1 – 100 µg L <sup>-1</sup>	[534]
ENRO	Suero porcino	No necesario	Electroquímico – Impedimétrico	LOD: 1 µg L <sup>-1</sup> DR: 1 – 1000 µg L <sup>-1</sup>	[535]

Tabla 15. Continuación.

Compuestos determinados	Matriz	Pretratamiento de la muestra	Transductor	Figuras de mérito	Ref
Triazinas					
ATR, SIM	No aplicado a muestras reales	--	Óptico –TIRF	LOD: 0.2 – 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$	[536]
ATR	No aplicado a muestras reales	--	Óptico – PM–RAIRS	LOD: 0.32 $\mu\text{g L}^{-1}$ IC <sub>50</sub> : 4 $\mu\text{g L}^{-1}$	[537]
ATR	Agua potable y de río	Fil. (0.2 $\mu\text{m}$ )	Electroquímico – Impedimétrico	LOD: 10 $\text{pg L}^{-1}$ DR: 0.01 – 1000 $\text{ng L}^{-1}$	[538]
ATR	No aplicado a muestras reales	--	Electroquímico – Voltamperométrico	LOD: 0.2 $\text{ng L}^{-1}$	[539]
ATR	Vino tinto	SPE (LiChrolut RP-18) + dil.	Electroquímico – Conductimétrico/ Impedimétrico	LOD: 0.034 – 0.489 $\mu\text{g L}^{-1}$	[540, 541]
ATR	Zumo de naranja	Ajuste pH 7.5 + dil. 1:5 + fil. (0.2 $\mu\text{m}$ )	Electroquímico – Voltamperométrico	LOD: 6 $\text{ng L}^{-1}$	[551]

ATR	Agua potable, de río y de pozo	Dil. 9:10 + fil. (0.45 µm)	Óptico – SPR	LOD: 20 ng L <sup>-1</sup>	[543]
ATR	Agua de pozo y de fuente	SPE (C18) + dil. 1:5	Óptico – Fluorescencia	LOD: 1.0 µg L <sup>-1</sup>	[544]
ATR	No aplicado a muestras reales	--	Electroquímico – Impedimétrico	LOD: 10 ng L <sup>-1</sup>	[545]
ATR	No aplicado a muestras reales	--	Nanomecánico	LOD: 1 – 7 ng L <sup>-1</sup>	[546]

ATR: atrazina; BSA: albúmina de suero bovino; CCo: límite de decisión; Cent.: centrifugación; CIPRO: ciprofloxacino; CL: quimioluminiscencia; Dil.: dilución; Dis.: disolución; DR: intervalo dinámico; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; ENRO: enrofloxacin; Fil.: filtración; FLU: Flumequino; GATI: gatifloxacino; IC<sub>50</sub>: valor de la concentración de analito en el punto de inflexión de la curva de calibración; LLE: extracción líquido-líquido; LOD: límite de detección; MIP: polímero de impronta molecular; NOD: Nodularina; NOR: norfloxacino; PM-RAIRS: espectroscopía infrarroja de reflexión-absorción combinada con modulación de polarización; Qs: quinolonas; RMN: resonancia magnética nuclear; SIM: simazina; SLE: extracción sólido-líquido; SPE: extracción en fase sólida; SPR: resonancia de plasmones superficiales; TIRF: fluorescencia de reflexión interna total; UAE: extracción asistida por radiación de ultrasonidos; UV-vis: ultravioleta-visible.



## AIM OF RESEARCH

---



The aim of this thesis was the development of new methods and analytical tools to monitor the presence of contaminants in food and environmental samples. This research has been focused on the analysis of three different families of contaminants: fluoroquinolone antibiotics, triazine pesticides and microcystin hepatotoxins. The first two groups include contaminants of anthropogenic origin, while the third one corresponds to naturally occurring toxins. The analysis of these compounds is of particular interest, due to the significant environmental and health impacts of their presence in foods and surface water samples.

The individual objectives of this study were:

1. Development of a method for the determination of fluoroquinolone residues, in whole eggs, based on pressurized liquid extraction (PLE) and chromatographic separation with fluorescent detection (HPLC-FLD).
2. Development of a flow-injection immunoassay with fluorescence detection for the determination of triazine herbicides in surface waters.
3. Development of biosensors based on different optical transducers for the detection of microcystins in freshwater samples.
4. Synthesis and characterization of dextran-lipase conjugates and further application as tools for low molecular weight ligand immobilization in biosensing platform development.
5. Development of biosensing platforms for the multi-analysis of triazines, fluoroquinolones and microcystins in environmental water samples.
6. Validation and application of the developed methodologies to the analysis of real samples.

Special efforts have been focused on the development of highly sensitive, selective, robust and reproducible methodologies, suitable for their application to the direct analysis of food and environmental samples contaminated with the selected targets at trace concentrations levels.





# PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

---



En este apartado se incluyen los artículos científicos publicados hasta el momento, en los que se describen las investigaciones realizadas para poner a punto *nuevas herramientas analíticas para la determinación de contaminantes en el medio ambiente y en alimentos*, de acuerdo los objetivos de la presente Tesis. Los artículos se han publicado en revistas destacadas del área de Química Analítica como *Biosensors and Bioelectronics*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* o *Journal of Chromatography A*.

Como se ha indicado en el apartado de Introducción, el empleo rutinario de antibióticos (e.g. FQs) en la cría intensiva de animales de granja representa un riesgo potencial para los consumidores. La Unión Europea ha establecido LMRs para antibióticos FQs en diferentes matrices, sin embargo, su uso en gallinas ponedoras todavía no está permitido, aplicándose el principio de tolerancia cero en alimentos como el huevo. Cuando los antibióticos se emplean con fines terapéuticos, debe guardarse un periodo de espera, antes de la recogida de los huevos, para facilitar que el animal elimine los residuos del fármaco administrado, requiriéndose métodos analíticos que permitan determinar niveles muy bajos de estas sustancias en este tipo de matriz.

Los métodos disponibles hasta el momento de iniciarse las investigaciones descritas en la Tesis estaban basados, fundamentalmente, en la combinación de técnicas de extracción (i.e. LL, SPE, SFE) y análisis cromatográfico mediante LC con detección UV-Vis, FLD o MS. En todos los casos, la preparación de muestra era la etapa crítica del análisis, ya que las FQs pueden, por ejemplo, unirse a las lipoproteínas de la matriz y formar emulsiones en presencia del disolvente de extracción, disminuyendo la eficacia del proceso. Es por ello que la investigación se centró en la optimización de un método analítico basado la extracción con disolventes presurizados (PLE) y posterior análisis cromatográfico con detección fluorescente (HPLC-FLD), para el análisis de residuos de enrofloxacino (ENRO), ciprofloxacino (CIPRO) y sarafloxacino (SARA), en muestras de huevo. La aplicación de la PLE tenía como objetivo reducir el tiempo y coste asociado a la etapa de tratamiento de muestra, gracias a la automatización del proceso, así como la obtención de extractos que pudieran analizarse cromatográficamente, sin etapas adicionales de limpieza.

De este modo, el trabajo “*Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of Fluoroquinolone residues in table eggs*” (*J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 63–70) describe la optimización de las principales variables que influyen en el proceso de extracción de las FQs empleando la técnica PLE (i.e. naturaleza del disolvente de extracción, temperatura y número de ciclos de extracción),

con el propósito de seleccionar las condiciones más adecuadas para la extracción de dichos antimicrobianos. Además, se evaluaron otros factores relacionados con el pretratamiento de la muestra que pueden afectar al proceso de extracción PLE, como el tipo de hidromatriz empleada. Por último, el método optimizado se validó de acuerdo con los criterios de la Decisión 2002/657/EC de la Comisión Europea, aplicándose al análisis de muestras de huevos procedentes de gallinas tratadas con el medicamento de uso veterinario Hipralona Enro S, que contiene un 10% del antibiótico ENRO.

Las técnicas cromatográficas con diferentes sistemas de detección también se emplean de forma habitual para la monitorización del contenido de contaminantes en muestras de agua. No obstante, en los últimos años se ha invertido un gran esfuerzo en el desarrollo de técnicas alternativas, como las técnicas inmunoquímicas y biosensores, debido, como se ha expuesto en la Introducción, a su alto potencial para ser utilizados como métodos de “barrido” (*screening*). La facilidad de automatización que presentan algunos de estos métodos, así como la posibilidad de emplearlos en medidas de campo, permite disminuir la manipulación de la muestra, eliminar los costes derivados de su transporte al laboratorio y de su almacenamiento, así como la necesidad de contratar personal altamente cualificado, lo que resulta muy ventajoso desde el punto de vista analítico.

En este capítulo se recogen los resultados obtenidos en relación al desarrollo de inmunosensores ópticos para la determinación de contaminantes en aguas, empleando distintos formatos de ensayo y transductores ópticos. Como objeto de estudio se han seleccionado tres familias de contaminantes de muy distinta naturaleza, tanto de origen natural (*i.e.* MCs), como antropogénico (*i.e.* TRZs y FQs). Durante el desarrollo del trabajo, se evaluó el efecto de distintos parámetros experimentales sobre la respuesta de los inmunoensayos. Tras su optimización, se ha llevado a cabo la caracterización de los biosensores, determinando su límite de detección, valor de  $IC_{50}$  e intervalo dinámico, así como su respuesta frente a otros metabolitos (reactividad cruzada). Por último, los sensores desarrollados se han aplicado al análisis de muestras de agua.

En un primer trabajo, llevado a cabo en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Pilar Marco del IQAC-CSIC (Barcelona), se desarrolló un biosensor en flujo, totalmente automatizado, para el análisis de TRZs. Con este fin se optimizó un inmunoensayo enzimático de tipo competitivo y detección fluorescente, donde el analito presente en la muestra compite con un análogo marcado del analito por los sitios específicos de reconocimiento del Ab. El inmunosensor se automatizó empleando un sistema de bombas de jeringa que permiten la inyección programada de las

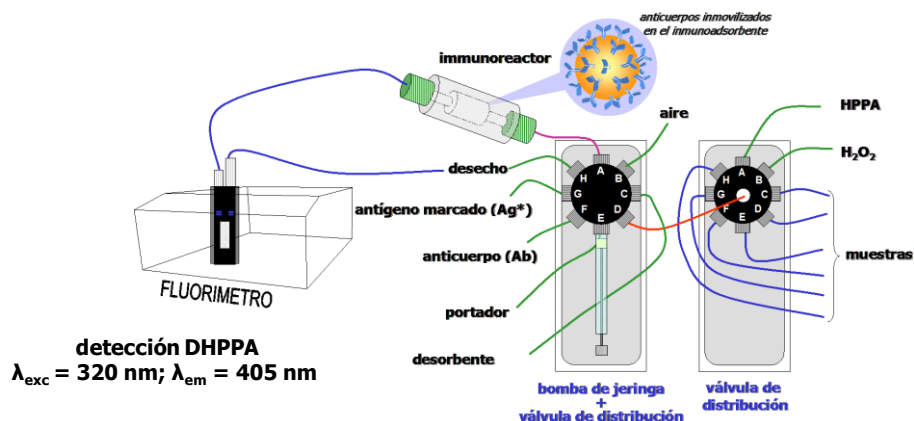


Figura 20. Esquema del dispositivo de medida empleado para el desarrollo del fluoroinmunoensayo [96].

disoluciones de muestra, lavado y regeneración del inmovisor. El dispositivo de medida, que se muestra en la Figura 20, consta de una bomba de jeringa conectada a una válvula de distribución de 8 canales. Uno de los canales está conectado a una segunda válvula de distribución adicional, de modo que el sistema presenta un total de 15 entradas. Otro canal está conectado a un reactor de polimetacrilato de metilo en el que se empaqueta el inmovisor. Por último, el reactor está conectado a una célula de flujo que se dispone en el detector fluorimétrico.

Los resultados de esta investigación se recogen en el trabajo “*Preparation of antibodies and development of a sensitive immunoassay with fluorescence detection for triazine herbicides*” (Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 1801–1812). Se optimizaron distintos parámetros característicos del inmunoensayo en flujo (i.e. naturaleza del inmovisor, concentración de anticuerpo y trazador enzimático, naturaleza y concentración del sustrato enzimático, concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pH y fuerza iónica de la disolución portadora) y, a continuación, se llevó a cabo la caracterización analítica del mismo. El fluoroinmunoensayo se aplicó a la determinación de SIM en muestras de agua y los resultados se validaron empleando dos métodos de análisis cromatográfico basados en SPE/GC-NPD y SPE/HPLC-DAD, respectivamente.

En relación a la determinación de toxinas de la familia de las MCs en muestras de agua dulce se han desarrollado tres biosensores ópticos basados en dos métodos de transducción óptica diferentes, i.e. resonancia de plasmones superficiales (SPR) y fluorescencia, comparándose sus características analíticas y su aplicabilidad para el control medioambiental de estas toxinas.

Una de las etapas críticas en el desarrollo de inmunosensores para la determinación de moléculas de bajo peso molecular, como es el caso de las MCs, es la selección del formato de ensayo más adecuado que permita llevar a cabo las medidas con máxima sensibilidad. Por este motivo se evaluaron, mediante SPR, distintos formatos de ensayo, tanto de tipo competitivo como no competitivo, inmovilizando sobre la superficie sensora: a) un anticuerpo selectivo a MCs; b) un conjugado proteico de MCLR o c) MCLR directamente. En el primer caso (a) se midió el incremento de la señal de SPR en presencia de concentraciones crecientes de MC en la muestra, debido a la formación del complejo Ab-MC (ensayo directo, no competitivo); alternatively, se realizó el ensayo en presencia de una concentración constante de un conjugado de MCLR con ovoalbúmina (Ag\*), evaluándose la disminución de la señal de resonancia medida en presencia de concentraciones crecientes de analito en la muestra (ensayo competitivo). En el segundo y tercer caso (b y c), se llevó a cabo un ensayo de tipo competitivo, en presencia de una concentración limitante de Ab, entre el analito presente en la muestra y la MCLR inmovilizada. En ambos casos, la señal de SPR disminuye al aumentar la concentración de analito en la muestra.

Se han evaluado distintos procedimientos de inmovilización de los biorreactivos sobre la superficie sensora. Entre las distintas metodologías ensayadas destacan la inmovilización covalente, la interacción avidina-biotina, adsorción física o técnicas de atrapamiento. En los dos primeros casos (inmovilización covalente e interacción avidina-biotina) fue necesario funcionalizar previamente la superficie, empleando monocapas autoensambladas (SAM) de tioles.

Los resultados obtenidos con cada uno de los formatos de ensayo evaluados se incluyen en el trabajo titulado “*An SPR Biosensor for the detection of Microcystins in drinking water*” (*Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 2625–2634). Tras la selección del formato más adecuado (i.e. inmunoensayo de tipo competitivo basado en la inmovilización covalentemente de MCLR sobre la superficie sensora), se optimizaron las principales variables que influyen en el desarrollo del inmunoensayo y por tanto, en la respuesta del sensor, procediendo a la caracterización analítica del mismo y a su aplicación al análisis de muestras reales.

Aplicando el formato de ensayo, optimizado anteriormente, se desarrolló un biosensor, basado en micromatrices (*microarrays*) de anticuerpos y medidas de fluorescencia por excitación con onda evanescente, para la determinación de MCs en agua dulce. Como superficie sensora se empleó un vidrio portaobjetos de microscopio, que actúa al mismo tiempo como guía de onda de la radiación. La inmovilización covalente de MCLR se realizó en zonas concretas del vidrio, previamente silanizado. La

detección de las MCs se llevó a cabo empleando la unidad portátil Leopard Array Biosensor™ HLAB-2002 (Hanson Technologies, Inc., EEUU), descrita en la Introducción del presente trabajo de Tesis (sección 1.1.2.2.).

El desarrollo de esta micromatriz selectiva a MCs se presenta en el trabajo titulado “*Automated portable array biosensor for multisample microcystin analysis in freshwater samples*” (Biosensors and Bioelectronics 33 (2012) 50–55), y supone una alternativa muy interesante para el análisis de esta familia de toxinas ya que permite el análisis, en una medida, de hasta 6 muestras de agua distintas, mediante un sistema automático, algo deseable cuando debe analizarse un elevado número de muestras de forma rutinaria.

Tras la optimización de distintas variables que afectan al desarrollo del inmunoensayo, prestando especial atención a la etapa de funcionalización de la guía de onda (inmovilización de MCLR) y la caracterización analítica del biosensor, el *microarray* se aplicó al análisis de distintas muestras de aguas de lagos y ríos de la geografía española, proporcionadas por el Centro de Estudios Hidrográficos del CEDEX (CEH-CEDEX). Los resultados se validaron mediante la técnica de HPLC-MS-MS.

Una de las etapas claves en el desarrollo de un inmunosensor es la integración del elemento de reconocimiento con el transductor. En este sentido, en el trabajo “*Dextran-Lipase Conjugates as Novel Tools for Low Molecular Weight Ligand Immobilization in Microarray Development*” (Anal. Chem., artículo enviado) se propone el empleo de conjugados hapténicos de lipasa de *Bacillus thermocatenolatus* (BTL2) modificada con dextrano, como alternativa a la funcionalización de las superficies sensoras con derivados de tioles, o silanos, con grupos funcionales reactivos para la posterior inmovilización covalente del hapteno.

Los conjugados proteicos se emplean habitualmente en el desarrollo de biosensores para la determinación de moléculas de bajo peso molecular, ya que pueden inmovilizarse en la superficie sensora mediante adsorción física, unión covalente o atrapamiento. Sin embargo, si el grado de conjugación (número de moléculas de hapteno por molécula de proteína) es bajo, o la orientación espacial de los haptenos inmovilizados no es adecuada, los biosensores desarrollados pueden ser poco sensibles.

Los conjugados hapténicos propuestos en la presente Tesis se basan en la modificación de la enzima BTL2 con una red de dextrano a la que, posteriormente se une covalentemente el hapteno. El empleo del dextrano tiene una doble función: 1) incrementar el número de grupos reactivos presentes en la superficie de la lipasa, para la conjugación de los haptenos y, 2) proporcionar un entorno hidrofílico flexible para



facilitar la interacción del hapteno inmovilizado con el Ab, mejorando el reconocimiento selectivo.

La síntesis de los conjugados se llevó a cabo en fase sólida, inmovilizando la BTL2, por interacciones hidrofóbicas a través de la zona del centro activo, sobre un soporte comercial de octil-agarosa (OS, del inglés *Octyl-Sepharose*). De esta forma es posible derivatizar la enzima con dextrano manteniendo intacta su actividad catalítica. Tras la unión de la red de dextrano sobre la lipasa, el conjugado se derivatizó con etilendiamina, para introducir grupos funcionales amino primario, y las quimeras BTL2-dextrano-aminado se aislaron y se emplearon, posteriormente, para el desarrollo de los biosensores. La unión de la red polimérica de dextrano a la proteína se confirmó y caracterizó mediante espectroscopía RAMAN y FTIR.

Para a su aplicación, los derivados BTL2-dextrano-aminado se inmovilizaron sobre guías de onda planas (superficie sensora) derivatizándose, *in situ*, con MCLR para desarrollo de un microarray selectivo a MCs. Se estudió el efecto de distintos parámetros que afectan al desarrollo del biosensor, en especial el peso molecular del espaciador de dextrano unido a la lipasa BTL2 (1.5 - 40 kDa), investigándose la correlación existente entre el tamaño del dextrano y la formación de superficies sensoras en 2D o 3D. Adicionalmente, se evaluó, mediante microscopía AFM, la morfología de la superficie antes y después de la inmovilización de los conjugados, así como durante las distintas etapas del inmunoensayo.

Este trabajo, ha sido fruto de la colaboración con varios grupos de investigación: el Prof. Guisan del Instituto de Catálisis, CSIC (preparación de los conjugados), la Prof. Marisela Vélez también del Instituto de Catálisis, CSIC (análisis de AFM), la Prof. Concha Domingo del Instituto Miguel Catalá, CSIC (análisis Raman e IR) y el Prof. Levi Gheber de la Ben Gurion University, Israel (estudios de simulación sobre la obtención de capas en 2D o 3D).

Posteriormente, los conjugados BTL2-dextrano se funcionalizaron con grupos epóxido para ampliar el abanico de moléculas que podían inmovilizarse en la guía de onda empleando esta aproximación. De esta forma se prepararon vidrios derivatizados con los conjugados unidos covalentemente a MCLR, antibióticos (CIPRO y ENRO), y herbicidas (SIM, ATR, DEA y DIA) o sus homólogos (2f y 2c). Las superficies resultantes se aplicaron al desarrollo de micromatrices de sensores para el análisis simultáneo de MCs, FQs y TRZs. Tras estudiar el efecto de distintos parámetros que afectan a la respuesta de la micromatriz (naturaleza y concentración del hapteno inmovilizado, así como de los anticuerpos empleados) se llevó a cabo la caracterización analítica de los *microarrays* multianalito.

Si bien la conjugación de los haptenos a la red de dextrano se llevó a cabo tras la inmovilización de los derivados BTL2-dextrano sobre la guía de onda, también es posible sintetizar previamente los conjugados BTL2-dextrano-hapteno, aislarlos y almacenarlos para su empleo posterior. Esta aproximación permite simplificar el proceso de funcionalización de la guía de onda, reducir el tiempo requerido para el ensayo y facilita la portabilidad del sistema que podría prepararse *in situ*, con la combinación de conjugados hapténicos requeridos para cada aplicación concreta.

Como prueba de concepto, se sintetizaron y aislaron los conjugados hapténicos BTL2-dextrano-CIPRO y BTL2-dextrano-2f. Tras la confirmación de la conjugación de los haptenos (CIPRO o 2f), mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), los conjugados se han aplicado al desarrollo de una matriz de biosensores para la determinación simultánea de FQs y TRZs, utilizando BTL-dextrano-biotina como control positivo. Los resultados de esta investigación serán enviados a publicar próximamente y el trabajo se encuentra en fase de redacción.



DEVELOPMENT OF A NEW SAMPLE PRETREATMENT PROCEDURE  
BASED ON PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION FOR THE  
DETERMINATION OF FLUOROQUINOLONE RESIDUES IN TABLE  
EGGS

S. Herranz, M.C. Moreno-Bondi, M.D. Marazuela

*Journal of Chromatography A* 1140 (2007) 63–70





## Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs

S. Herranz, M.C. Moreno-Bondi, M.D. Marazuela\*

*Laboratory of Optical Sensors, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain*

Received 21 April 2006; received in revised form 15 November 2006; accepted 20 November 2006

Available online 4 December 2006

### Abstract

A new method for the simultaneous determination of three fluoroquinolones (FQs) enrofloxacin (ENRO) ciprofloxacin (CIPRO) and sarafloxacin (SARA) in table eggs has been developed, applying pressurized liquid extraction (PLE) and liquid chromatography (LC) with fluorescence detection (LC-FLD). The influence of several extraction parameters (e.g. solvent mixture, temperature and extraction time) on FQs extraction efficiency and coextracted matrix interferents was evaluated using fortified control eggs and matrix matched standard curves. The results showed that FQs extraction efficiency depends mainly on solvent composition and the optimum extraction mixture was found to be phosphate 50 mM, pH 3.0/acetonitrile (50:50, v/v). The optimized procedure employed 50% flush volume, 5 min of static time and three extraction cycles at 70 °C and 1500 psi. Method validation was performed according to the guidelines of the Directive 96/23/EC, using control egg samples, fortified with the target FQs in the range 50–1000 ng g<sup>-1</sup> and applying the optimized extraction conditions on three different days, providing recoveries between 67–90% with RSDs lower than 11% in all cases. The decision limit (CC $\alpha$ ) and detection capability (CC $\beta$ ) of the analytical method were found to be within the range 17–24 ng g<sup>-1</sup> and 30–41 ng g<sup>-1</sup>, respectively. The method was successfully applied to the determination of ENRO and its metabolite CIPRO in incurred egg samples from ENRO-treated hens and LC–MS has been used and for confirmatory purposes.  
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Fluoroquinolones; Antibiotics; Pressurized liquid extraction; HPLC-FLD; Eggs

### 1. Introduction

The routine use of antibiotics to control diseases in farm animals may result in the presence of residues in foodstuffs of animal origin that can induce pathogen resistance to antibiotics used in human medicine [1,2]. As a consequence, the protection of public health against possible harmful effects of these veterinary drugs has been a main concern for the sanitary authorities [3]. In the past few years, new types of antibiotics have been developed to replace those which were losing their antibacterial activity. However, the majority of the antibiotics developed nowadays, are related to those already in use, so the need to preserve their effectiveness is even more urgent.

Fluoroquinolones (FQs) are a highly potent group of synthetic antimicrobials used both, in human and veterinary

medicine worldwide. Enrofloxacin (ENRO) and sarafloxacin (SARA) have been approved for the treatment of bacterial infections in poultry (e.g. turkeys and broiler chickens) and the European Union has established maximum residue levels (MRLs) of these drugs in different animal edible tissues [4]. Nevertheless, their use in laying hens has been forbidden because of the possibility that residues of these antibiotics could be transferred and accumulated in eggs. Failure to observe the label directions for these drugs or unintentional contamination of feed for laying hens could cause violative residues in eggs for human consumption. There are particular concerns about the health effects on babies: egg yolk products are included in some baby food, infant formula milk and supplementary feeds for premature babies. Therefore, the development of reliable analytical methods for the detection and quantitation of FQs in eggs is required, in order to: (a) ensure the safety of the egg supply; and (b) help to establish the MRLs and withdrawal periods, which would be of special importance for egg producers.

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 4322; fax: +34 91 394 4329.  
E-mail address: [marazuela@quim.ucm.es](mailto:marazuela@quim.ucm.es) (M.D. Marazuela).

The analysis of antibiotics in eggs is quite complex as they may bind to the lipoproteins and the extraction solvents form emulsions and foams with the egg matrix. The result is a poor isolation and purification of the antibiotics and therefore, lipids and proteins should be removed before analysis [5].

Different sample preparation methods have been described for the analysis of FQs in eggs, including extraction (LLE) [6–10], solid-phase (micro)extraction (SPE, SPME) [11–13], dialysis [14–16] and supercritical fluid extraction (SFE) [5]. The main limitations of these methods include the relatively low recoveries (>50–60%), the inability to simultaneously extract all the quinolones, the tedious and usually time-consuming procedures, as well as the special equipment required in some cases (e.g. microdialysis or SFE). Thus, new simple extraction methods for the determination of FQs in eggs are required that can provide good recoveries of the analytes, reducing sample manipulation and solvent consumption.

Pressurized liquid extraction (PLE) is a sample preparation technique that combines elevated temperature and pressure with liquid solvents to achieve fast and efficient extraction of the analytes from the solid matrix. Although PLE has been mainly applied in environmental analysis [17], more recently the potential of this technique is being exploited in food and biological samples for two main purposes: the extraction of contaminants and the isolation of matrix components [18,19]. PLE has several advantages over other extraction techniques (e.g., Soxhlet, microwave or ultrasonication), such as higher extraction efficiency, better reproducibility, reduced solvent consumption and sample manipulation and higher sample throughput due to its high degree of automation [18]. Only a few procedures based on PLE are available for the determination of antibiotic residues in foodstuffs [18]. Focusing on FQs, Pecorelli et al. [20] have applied PLE to the extraction of 13 quinolones from feedstuffs; but up to our knowledge, no other application concerning food samples and specially eggs, has been previously reported in the literature.

After extraction, the determination of FQs residues in eggs is usually performed by liquid chromatography (LC) with DAD [6,11,13] or preferably fluorescence (FLD) [5,7,9,10,13–15] and mass spectrometry (MS) detection [8,16] for confirmatory analysis. Other analytical techniques, such as capillary electrophoresis with MS detection (CE-MS), immunoassays and luminescence techniques have also been applied to the determination of FQs in other biological and food matrices [21–23]. FQs show a native fluorescence, with two excitation bands: a broad one (300–350 nm) and a second one with higher absorptivity, centred at 245–290 nm, as well as a wide emission band centred at 440–500 nm. This allows a sensitive and selective determination (multi-wavelength detection possibility), which still makes LC-FLD, one of the more preferred determination techniques for routine FQs residue analysis, in spite of the increasingly demand of the LC–MS based methods for confirmatory analysis [21,24], which are not widely available in many laboratories and required costly instrumentation. This paper describes for the first time a simple, fast and efficient extraction procedure based on PLE, which in combination with a previously described LC-FLD method [25] enables the determination of three FQs namely,

SARA, ENRO and its metabolite ciprofloxacin (CIPRO) in table eggs. The application of PLE allows the quantitative extraction of the target FQs from the egg matrix, without the need of further clean-up steps, prior to the chromatographic analysis. Different variables affecting PLE efficiency (e.g. extraction solvent, temperature, extraction time and type of dispersion agent) have been optimized, in order to get satisfactory recovery results and to minimize matrix effects. Validation of the proposed methodology has been performed following the rules of the Directive 96/23/EC [26]. The method has been successfully applied to the determination of ENRO and its biologically active metabolite CIPRO in incurred eggs and a LC–MS method has been applied for unequivocal confirmation of these residues.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and materials

Acetonitrile and methanol (HPLC grade) were provided by SDS (Peypin, France) and orthophosphoric acid (HPLC grade, 85%) from Fluka (Buchs, Switzerland). Ciprofloxacin hydrochloride (99.8%) (CIPRO) and enrofloxacin (99.7%) (ENRO) standards were a gift of Bayer (Leverkusen, Germany), sarafloxacin hydrochloride (90%) (SARA) was a gift from Fort Dodge Veterinaria (Girona, Spain). Lomefloxacin hydrochloride (LOME) from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA) was tested as internal standard. Chemical structures of the FQs included in this study are shown in Fig. 1. Quartz sand (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) and a modified form of diatomaceous earth (Isolute HM-N, Synta, Madrid, Spain) were tested as inert support materials for absorbing moisture and preventing compaction of the matrix during PLE extraction. Water was purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). All solutions prepared for HPLC were passed through a 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filter before use. The veterinary speciality Hipralona Enro-S (100 mg ENRO  $\text{mL}^{-1}$ ) from Laboratorios Hipra (Girona, Spain) was administered to the laying hens used in the animal study.

### 2.2. Instrumentation

Table eggs were homogenized with an Ultra-Turrax from IKA Labortechnik (Darmstadt, Germany). An ASE 200 system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), equipped with 11 mL stainless steel cells and lined with glass-fiber filters from Dionex (Grade GF/B part. No 047017) was used for PLE. Glass vials of 40 mL were used for collection of the extracts. The chromatographic system consisted of a HP-1100 HPLC from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, on-line degasser, autosampler, automatic injector, column heater and a fluorescence detection (FLD) system. A nitrogen evaporator (Zymark, Hopkinton, MA, USA) was used for concentration of the extracts.

For LC–MS confirmation analysis the HPLC system was coupled to a 3200 triple quadrupole tandem mass spectrometer from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), equipped with a turbo ionspray interface operated in positive mode. The



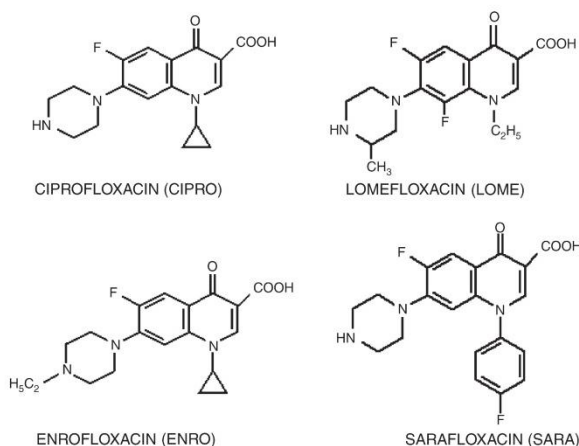


Fig. 1. Chemical structure and acronyms of the target FQs. Lomefloxacin (LOME) has been used as internal standard.

LC–MS interface was set at 550 °C and a dwell time of 0.08 s was used.

### 2.3. Standard solutions

Fluoroquinolone individual stock solutions were prepared in methanol at a concentration of 100 µg mL<sup>-1</sup>, taking into account the purity of the standards. These solutions were stored at 4 °C in the dark for not longer than one month. For quantitation of the extracts during method optimization, six-point matrix-matched calibration curves were constructed, by fortification of control egg extracts (2 mL) with the target FQs in the range from 10 to 300 ng mL<sup>-1</sup>. For recovery experiments and quantitation of the incurred egg samples, whole eggs were homogenized and sub samples of 2 g were spiked with increasing amounts of the selected FQ standard solutions, in the range 50–1000 ng g<sup>-1</sup>. LOME at a concentration of 500 ng g<sup>-1</sup> was used as internal standard. Recoveries were calculated as the ratio of the response (peak area) obtained for the spiked egg samples to that measured for the corresponding matrix-matched FQs standards in the HPLC system.

### 2.4. Pressurized liquid extraction

Amounts of 2 g of the homogenized whole eggs were mixed thoroughly with a dispersing agent, in order to obtain a porous mixture to enable the extraction solvent to flow through the sample during extraction. The mixture was poured into Dionex standard 11 mL stainless steel extraction cells, containing glass-fiber filters. Two types of dispersing agent were tested: quartz sand (8 g) and diatomaceous earth (2 g). Optimum conditions for the PLE method are summarized in Table 1. After the extraction, the total volume was always close to 16 mL, so all samples were made up to a final volume of 20 mL and then, filtered through glass-fiber filters, previously checked for not retaining

the analyzed FQs, in order to remove the co-extracted lipids and proteins. The extraction cells were cleaned between each run by ultrasonication for around 15 min in methanol. Then, 5 mL aliquots of the raw extracts were evaporated to dryness at 60 °C, using a nitrogen evaporator, and subsequently dissolved by vortex mixing in 2 mL of the mobile phase. Finally, for the chromatographic analysis, 8 µL were injected into the HPLC system.

### 2.5. LC-FLD conditions

Chromatographic separation of the target FQs was performed on an AQUA<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> (polar endcapped) (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) column protected by a RP18 guard column (4.0 mm × 3.0 mm, 5 µm), both from Phenomenex (Torrance, CA, USA). A gradient programme was used with the mobile phase, combining solvent A (25 mM orthophosphoric acid adjusted to pH 3.0 with NaOH) and solvent B (acetonitrile) as follows: 18% B (4 min), 18–37% B (8 min), 37% B (1 min), 37–18% B (2 min), 18% B (3 min). The flow rate was

Table 1  
Optimized PLE conditions for the extraction of FQs from egg samples

Extraction solvent	Phosphate 50 mM pH 3.0/acetonitrile (50/50) (v/v)
Pressure (psi)	1500
Temperature (°C)	70
Heat-up time (min)	5
Static time (min)	5
Flush volume (%)	50
Purge time (min)	1
Number of cycles	3
Cell volume (mL)	11
Total extraction time (min)	21 <sup>a</sup>
Total solvent used (mL)	16 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Per sample.



Table 2

Influence of the solvent extraction on the recoveries (%) of FQs from egg samples

Antibiotic	Methanol		Acetonitrile		Phosphate <sup>a</sup> /methanol (50:50, v/v)		Phosphate <sup>a</sup> /acetonitrile (50:50, v/v)		Phosphate <sup>a</sup> /acetonitrile (70:30, v/v)	
	R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%
CIPRO	44	23	28	15	50	9	71	12	66	16
LOME	47	23	31	9	57	3	70	5	62	17
ENRO	69	18	44	14	60	2	71	10	68	14
SARA	47	30	36	12	51	5	73	9	65	18

Spiking level 1250 ng g<sup>-1</sup> (n = 3), pressure 1500 psi, temperature 60 °C, 3 cycles of 5 min each.<sup>a</sup> Phosphate buffer 50 mM, pH 3.0.

1.0 mL min<sup>-1</sup> and the injection volume 8 µL. The fluorescence excitation/emission wavelengths were set at 280/440 nm, respectively.

## 2.6. LC–MS conditions.

Separation of ENRO and CIPRO was carried out on a Synergi MAX-RP (150 mm × 2 mm, 4 µm) column from Phenomenex at 30 °C. The injection volume was 10 µL. The mobile phase consisted of a mixture of water with a 0.1% of formic acid (solvent A) and acetonitrile with 0.1% of formic acid (solvent B), operating under gradient conditions as follows: 10–90% B (10 min, flow rate 200 µL min<sup>-1</sup>), 90–10% B (0.1 min, flow rate 300 µL min<sup>-1</sup>), 10% B (5 min, flow rate 300 µL min<sup>-1</sup>). The LC–MS interface was set at 550 °C. For confirmation purposes, the MS instrument was operated in positive mode and the selected ion recording mode (SIR) was chosen with a dwell time of 0.08 s. Four unique ions of each FQ were monitored, including the pseudomolecular ion [M + H]<sup>+</sup>, [MH – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, [MH – CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> and [MH – CO<sub>2</sub> – NR]<sup>+</sup>.

## 2.7. Incurred egg samples of ENRO-treated hens

Six laying hens were orally treated over four consecutive days with 10 mg Kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> of Hipralona Enro-S. Once treatment had begun, eggs were collected daily during 15 days. The daily production of eggs was pooled in three different lots of two individual eggs and treated as three different replicates. After homogenization, whole egg samples were analyzed following the procedure described in Section 2.4.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimization of the extraction process

Initial studies were performed to evaluate the influence of solvent, temperature and number of extraction cycles on extraction efficiency, with the aim to find the most suitable conditions to be used for FQs extraction. At first, various solvent mixtures were tested. Once the optimum solvent was found, the impact of varying the temperature and the number of cycles was also evaluated. Pressure in PLE is used to keep the extraction solvents liquid when they are heated above their boiling points. However, when water is used as extraction solvent (authors tend

to refer it as subcritical water extraction), efficiency seems to depend primarily on the extraction temperature and the number of extraction cycles and pressure has only a minor influence [27]. Besides this, other factors related to sample pretreatment that might affect PLE extraction (e.g. type of dispersion agent) were also evaluated.

#### 3.1.1. Extraction solvent

The extraction solvent must be able to solubilize the analytes of interest, minimizing the co-extraction of other matrix components. Moreover, it is also important to take into account the compatibility of the solvent with later analytical steps (e.g. extract clean up, preconcentration, or the analytical technique), as well as the volatility of the solvent if extract concentration is necessary.

Taking these facts into account, pure organic solvents alone or in combination with aqueous mixtures were tested and the results, regarding extraction efficiency of the target FQs from the egg matrix are shown in Table 2. Pure organic solvents, such as acetonitrile or methanol, as well as aqueous phosphoric acid/methanol mixtures were able to extract the target FQs from the egg matrix in a certain degree (Table 2); however, aqueous phosphoric acid/acetonitrile was shown to be the most effective solvent mixture for extraction of FQs, as it has been already pointed out by other authors [20,28,29]. Since FQs have in their structure a piperazinyl moiety with two pK<sub>a</sub> values (pK<sub>a1</sub> = 5.5–6.0, pK<sub>a2</sub> = 7.5–8.5) [30], they behave as zwitterions at neutral pH and consequently, they are difficult to extract in a polar solvent (such as acetonitrile). However, when acidic conditions are used (acetonitrile and phosphoric acid pH 3.0), the aqueous solubility of FQs increases as they are in cationic form. Strong acids (e.g., hydrochloric or nitric acid) have to be avoided in PLE extraction, because under elevated temperature they could oxidize the steel components of the extraction cell. Thus, a 50 mM aqueous phosphoric acid (pH 3.0)/acetonitrile (50:50, v/v) mixture was selected as extraction solvent because it provided cleaner extracts and better precision. When the percentage of aqueous phase was increased to 70%, cloudy extracts were obtained that led to sample manipulation problems and consequently to poorer precision.

#### 3.1.2. Dispersing agent

PLE often requires dispersion of the sample with an inert material in order to: (1) avoid sample aggregation or prevent

clogging of the extraction cell and (2) allow a greater exposure surface and hence, a better contact of the extraction solvent with the matrix. To this aim, diatomaceous earth or quartz sand have been the two agents most frequently used in PLE [18]. Preliminary experiments have been carried out, to evaluate a likely interaction between the hydromatrix and the target FQs. To this purpose, the antibiotics were directly spiked into the hydromatrix (diatomaceous earth or quartz sand), in the absence of the sample matrix and extracted in triplicate, according to the experimental conditions summarized in Table 1. In all cases recoveries above 88% were obtained, ensuring that no losses of the analytes occurred due to the adsorption of the FQs into the hydromatrix. However, when fortified egg samples were extracted, the recovery values ranged between 74 and 88% (RSD=3–10%,  $n=3$ ) by using diatomaceous earth and between 39 and 42% (RSD=3–13%,  $n=3$ ) with quartz sand. This could be explained considering the better capacity of diatomaceous earth to adsorb the samples, due to the higher porosity of this material, that improves the contact of the sample with the extraction solvent and thus, the extraction efficiency. In fact, only 1 g of diatomaceous earth per gram of egg sample was sufficient, in contrast to the 4 g, which were required in the case of quartz sand.

### 3.1.3. Temperature

We studied the effect of temperature on the recoveries of the selected FQs by performing extractions between 60 and 80 °C (Fig. 2). It has not been observed evidence of thermal degradation of FQs at temperatures lower than 100 °C [29]. However, when applying higher temperatures (100 °C) in the PLE method, a larger fraction of egg soluble organic matter was extracted and the extremely dirty extracts could not be redissolved in the mobile phase. In addition, temperatures over 100 °C should be avoided when using phosphoric acid to prevent oxidation of the extraction cell [18]. Recovery values between 69 and 82% (RSD=4–12%,  $n=3$ ) were obtained in the temperature range from 60–80 °C. A cloudy suspension could be visibly noticed in the raw extracts with increasing temperatures (60 °C < 70 °C < 80 °C). The best recoveries (>75%) and precisions, with values 6–10%, were obtained at 70 °C, thus this temperature was chosen for subsequent extractions, as a compromise between extraction efficiency of FQs, precision and amount of coextracted matrix components.

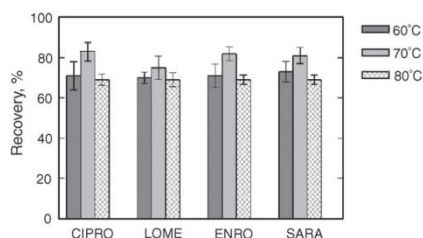


Fig. 2. Effect of temperature on the PLE extraction of FQs from egg samples. Spiking level 1250 ng g<sup>-1</sup> ( $n=3$ ). Solvent: phosphate 50 mM pH 3.0/acetonitrile (50/50) (v/v); pressure 1500 psi; 3 cycles of 5 min each.

### 3.1.4. Number of extraction cycles

To investigate the effect of this parameter on the extraction efficiency of the FQs from the egg matrix, the static time was set at 5 min and the number of extraction cycles was varied between two and four, with the corresponding increment in the extraction time from 10 to 20 min (Fig. 3). In general, an increment of the number of extraction cycles allows the exposure of the matrix to fresh solvent and favors the solvent/sample equilibrium, improving partitioning into the liquid phase and thus, increasing analyte recoveries. In this particular case, the number of cycles did not play an important role in extraction efficiency, since negligible differences were found between the application of two, three or four cycles with extraction yield values ranging between 70 and 78% (RSD=2–7%,  $n=4$ ). Finally, 3 extraction cycles (15 min extraction time) were selected to ensure an efficient extraction of the antibiotics from incurred eggs, which can sometimes be more problematic because of the differences in analyte-matrix binding.

### 3.2. Method validation

Validation of the PLE-HPLC-FLD method has been performed according to the requirements defined by the guidelines of the Commission Decision 2002/657/EC, which establishes the performance criteria for analytical residue methods [26]. The validation procedure includes the determination of the specificity, recoveries, precision in terms of repeatability and within-laboratory reproducibility, decision limit (CC $\alpha$ ), detection capability (CC $\beta$ ) and robustness.

The specificity of the method was assessed by testing a number of 20 control eggs, to verify the absence of potential interfering compounds. Typical chromatograms of control egg extracts and fortified egg samples are shown in Fig. 4. The obtained chromatograms did not show any interference, as no detectable matrix peaks were eluted in the retention time window of the target FQs. The limit of decision (CC $\alpha$ ) is defined as the analyte concentration at or above which it can be concluded with an error probability ( $\alpha=1\%$ ) that a sample is not compliant; whereas the detection capability (CC $\beta$ ), for substances for which not permitted limit has been established (as it is the case of the FQs in eggs, for which not LMRs have been defined) is

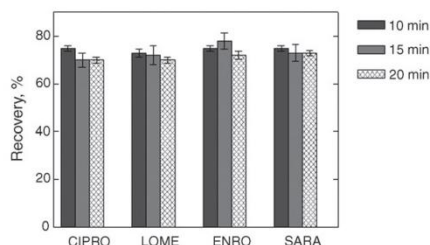


Fig. 3. Effect of the number of cycles on PLE extraction of FQs from egg samples. Spiking level 600 ng g<sup>-1</sup> ( $n=3$ ). Solvent: phosphate 50 mM pH 3.0/acetonitrile (50/50) (v/v); pressure 1500 psi; temperature 70 °C, static time 5 min.

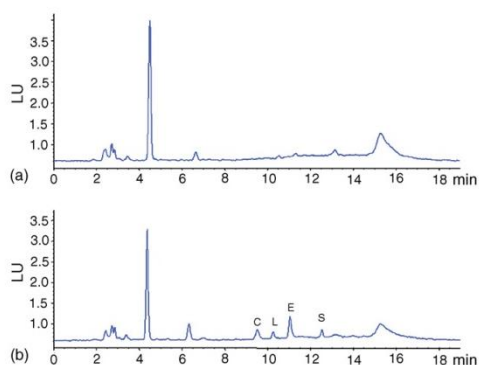


Fig. 4. Typical chromatograms of: (a) a control egg extract and (b) extract of an egg sample fortified with 50 ng g<sup>-1</sup> of CIPRO (C), LOME (L), ENRO (E) and SARA (S). Extraction and chromatographic conditions are described in Sections 2.4 and 2.5, respectively.

the lowest concentration at which a method is able to detect truly contaminated samples with an error probability ( $\beta=5\%$ ) [26]. Following these criteria specified in the Directive 96/23, CC $\alpha$  and CC $\beta$  were calculated from three calibration curves, performed on different days by spiking control egg samples with the FQs in the range 20–1000 ng g<sup>-1</sup> and 500 ng g<sup>-1</sup> of the IS. CC $\alpha$  and CC $\beta$  values from 17–24 ng g<sup>-1</sup> and from 30–41 ng g<sup>-1</sup> were obtained, respectively.

For quantitation of the absolute recoveries during method optimization and validation, six-point matrix matched calibration curves were prepared by fortification of control egg extracts with each of the target FQs, within the range 10–300 ng mL<sup>-1</sup>, thus assuring a perfect match between analyzed samples and standard curves. Under the instrumental conditions reported in the experimental section, the calibration curves presented good linearity ( $R^2$  for all curves were >0.999). To evaluate the accuracy and intraday repeatability of the method, control egg samples, spiked at three concentration levels (50, 200 and 600 ng g<sup>-1</sup>,  $n=12$ ) were analyzed using the optimized analytical method. The results are collected in Table 3. Recoveries of 66–89% were obtained for the target FQs at all fortification levels with RSDs lower than 9%. Mean recoveries of the IS at the spiked level (500 ng g<sup>-1</sup>) were (75  $\pm$  10)%. To determine the linearity and the reproducibility of the whole analytical method,

Table 3

Intraday recoveries (%) and precision (RSD%) obtained for the analyzed FQs after PLE extraction of egg samples spiked at different concentration levels ( $n=4$ )

ANTIBIOTIC	50 ng g <sup>-1</sup>		200 ng g <sup>-1</sup>		600 ng g <sup>-1</sup>	
	R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%
CIPRO	67	9	78	5	89	2
ENRO	66	5	77	3	78	6
SARA	74	6	74	7	73	5

control egg samples were fortified with the FQs in the range 50–1000 ng g<sup>-1</sup> and 500 ng g<sup>-1</sup> of LOME was added as IS. Sample analysis according to the procedure described in Sections 2.4 and 2.5 was performed in triplicate on three different days. In this step, the final extracts were redissolved in 1 mL mobile phase instead of 2 mL, as it is described in the Experimental section, in order to increase the sensitivity. The parameters of the method's validation are shown in Table 4. No significant differences (95% confidence limit) were observed between the calibration slopes obtained for the analytes in different assay days, confirming robustness of the analytical method. Thus, reproducibility of the whole analytical method was evaluated from the recovery percentages at each spiked level of the regression curves by interpolation of the peak area values in the matrix-matched calibration curves. Excellent reproducibility was achieved for all the antibiotics with mean recovery values of 68–88% for ENRO, 67–90% for CIPRO and 71–87% for SARA and RSDs lower than 11% in all cases.

### 3.3. Analysis of incurred egg samples.

To further validate the feasibility of the method for the analysis of real samples, we analyzed whole eggs from hens dosed with ENRO during four consecutive days and collected for 15 days. A chromatogram of an incurred egg sample collected on the day 8 is shown in Fig. 5, indicating the presence of both ENRO and its metabolite CIPRO. The fluorescence excitation and emission spectra of the peak maxima have confirmed the identity of these antimicrobials. Quantitation of ENRO and CIPRO in the incurred samples was performed by interpolation in six points calibration curves made with spiked control eggs, as described in Section 2.3. The results were used to construct the depletion curves of ENRO and its metabolite CIPRO in whole eggs (Fig. 6), in order to help to establish the MRLs for these residues in this foodstuff, as well as the withdrawal periods. The error bars represent the RSD for each daily sample set, which are related to the differences in residue concentrations in eggs collected from individual laying hens on a specific day. ENRO concentrations reached high levels already 2 days after the beginning of the treatment and the highest values were observed two days after the last drug administration. Thereafter, ENRO concentrations fell rapidly within

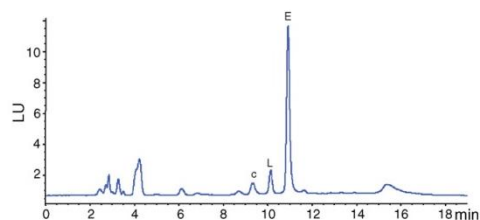


Fig. 5. Chromatogram of the extract of an incurred whole egg sample from ENRO-treated hens. CIPRO (C), LOME (L), ENRO (E). Extraction and chromatographic conditions are described in Sections 2.4 and 2.5, respectively.



Table 4

Interday mean recovery (%) and precision (RSD%) data for the determination of FQs in fortified egg samples, performed on three different days

ANTIBIOTIC	Spiked amount (ng g <sup>-1</sup> )	R%	RSD%
CIPRO $A_C/A_{IS} = (371 \pm 4)10^{-5}C + (0.03 \pm 0.02)^a$	50	67	8
	100	86	4
	200	87	9
	400	87	10
	600	90	7
	1000	83	8
ENRO $A_E/A_{IS} = (882 \pm 10)10^{-5}C - (0.05 \pm 0.05)^a$	50	68	5
	100	75	6
	200	80	10
	400	83	10
	600	88	7
	1000	82	6
SARA $A_S/A_{IS} = (210 \pm 2)10^{-5}C - (0.006 \pm 0.01)^a$	50	71	6
	100	80	5
	200	82	11
	400	83	10
	600	87	8
	1000	81	7

<sup>a</sup> Average calibration equation. Uncertainty values calculated at a 95% confidence limit; six data points ( $n=3$ ). C: FQ concentration (ng g<sup>-1</sup>); IS: Lomefloxacin (500 ng g<sup>-1</sup>).

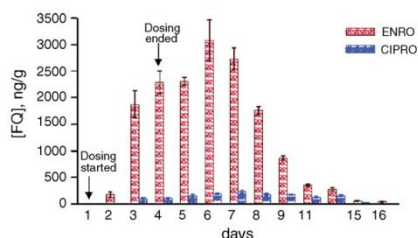


Fig. 6. Four-day dosing and twelve-day withdrawal bar graph for ENRO and CIPRO in whole eggs from ENRO-treated hens.

3 days and much more slowly over the following days. Concerning CIPRO, the levels found were always much lower than those for ENRO, but remained practically constant during the whole collection period. Although statistical assessment

is not available because of the limited number of samples, the results shown in Fig. 6 reveal the trend of elimination of these drugs in whole eggs and are in agreement with previous data [13,14].

In the present work, the LC–MS technique was used to unambiguous identification of ENRO and CIPRO in incurred egg samples, in accordance with recommendations of the Commission Decision 2002/657/EC. For confirmation of ENRO and CIPRO by LC–MS–MS analysis, the pseudomolecular ions  $[M+H]^+$  at  $m/z$  360 and 332, respectively, were used in combination with other diagnostic ions obtained by collision induced dissociation of the precursor ions:  $[MH-CO_2]^+$  316  $m/z$ ;  $[MH-H_2O]^+$  342  $m/z$  and  $[MH-CO_2-NR]^+$  245  $m/z$  for ENRO and  $[MH-CO_2]^+$  288  $m/z$  and  $[MH-CO_2-NR]^+$  245  $m/z$  for CIPRO. As an example, Fig. 7 shows the LC–MS–MS chromatograms of an incurred egg sample, corresponding to day 6 of the depletion curve when maximum levels for ENRO are observed.

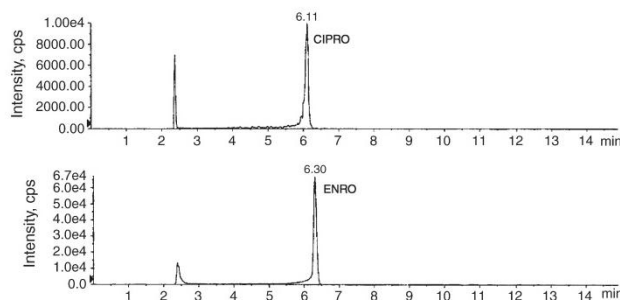


Fig. 7. LC–MS–MS chromatograms of an incurred egg sample. Precursor-product ion combination of  $m/z$  360/316 for ENRO and  $m/z$  332/245 for CIPRO.

#### 4. Conclusions

This work reports for the first time the application of PLE to the extraction of three FQs from whole egg samples. The method allows obtaining recoveries comparable to the most commonly applied extraction methods, without the need of further clean up steps and increasing sample throughput due to the high PLE automation grade. The optimized PLE procedure provided good accuracy and precision values by choosing a solvent mixture composed of phosphate 50 mM, pH 3.0/acetonitrile (50:50, v/v), which led to higher recoveries and cleaner extracts. Temperature and time did not play an important role in the extraction efficiency; however cloudy suspensions and dirty extracts could be observed when increasing the extraction temperature from 60 to 80 °C. The decision limit (CC $\alpha$ ) and detection capability (CC $\beta$ ) of the analytical method were found to be within the range 17–24 ng g<sup>-1</sup> and 30–41 ng g<sup>-1</sup>, respectively, showing that the method could be useful for the determination of FQs residues in contaminated eggs and screening of illegal use of FQs in laying hens. The method was successfully applied to the analysis of ENRO and CIPRO in incurred egg samples from ENRO-treated hens and confirmation of such residues has been performed by LC–MS analysis.

#### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge to the Spanish Ministry of Education and Science (Project No CAM ref. S-0505/AMB/0374) for financial support and for a Ramón y Cajal contract for MDM. We would like to acknowledge Bayer AG (Leverkusen, Germany) and Fort Dodge Veterinaria (Girona, Spain) for providing the reference compounds. We also thank R. Puig for providing us the incurred egg samples and O. Cadahía and P. Gigoso from the Public Health Laboratory of Lugo (Spain) for performing the LC–MS analysis.

#### References

- [1] S.A. McEwen, P.J. Fedorka-Cray, *Clin. Infect. Dis.* 34 (Suppl. 3) (2002) S93.
- [2] A.E. Van den Bogaard, E.E. Stobberingh, *Int. J. Antimicrob. Agents* 14 (2000) 327.
- [3] The White Paper on Food Safety, European Commission, Brussels, 2000. [http://europa.eu.int/comm/dgs/health\\_consumer/library/pub/pb06.en.pdf](http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/pub/pb06.en.pdf).
- [4] Official Journal of the European Union, L224 991 August 1990 Council Regulation 2377/90/EC of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Brussels, 1990.
- [5] J.H. Shim, M.H. Lee, M.R. Kim, Ch.J. Lee, I.S. Kim, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 6 (2003) 1342.
- [6] N. Gorla, E. Chiostri, L. Ugnia, A. Weyers, N. Giacomelli, R. Davicino, H.G. Ovando, *Int. J. Antimicrob. Agents* 8 (1997) 253.
- [7] P.S. Chu, R.C. Wang, H.F.V. Chu, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4452.
- [8] M. Schneider, D.J. Donoghue, *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 39.
- [9] Z. Zeng, A. Dong, G. Yang, Z. Chen, X. Huang, *J. Chromatogr. B* 821 (2005) 202.
- [10] I. García, L. Sarabia, M.C. Ortiz, J.M. Aldama, *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 190.
- [11] P.G. Gigoso, P.R. Revesado, O. Cadahia, C.A. Fente, B.I. Vázquez, C.M. Franco, A. Cepeda, *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 31.
- [12] V.F. Samanidou, E.A. Christodoulou, I.N. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 555.
- [13] J.F. Huang, B. Lin, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1228.
- [14] R.J. Maxwell, E. Cohen, D.J. Donoghue, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1563.
- [15] M. Schneider, D.J. Donoghue, *J. AOAC Int.* 83 (2000) 1306.
- [16] M. Lolo, S. Pedreira, C. Fente, B.I. Vázquez, C.M. Franco, A. Cepeda, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2849.
- [17] H. Giergielewicz-Mozajska, L. Dabrowski, J. Namienik, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 149.
- [18] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Sevilla-Ruiz, J. Hernández-Méndez, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 1.
- [19] J.L. Urraca, M.D. Marazuela, M.C. Moreno Bondi, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 175.
- [20] I. Pecorelli, R. Galarini, R. Bibi, A. Floridi, E. Casciarri, A. Floridi, *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 81.
- [21] J.A. Hernández-Arteseros, J. Barbosa, R. Compañó, M.D. Prat, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 1.
- [22] C. Horstkotter, E. Jiménez, D. Barrón, J. Barbosa, G. Blaschke, *Electrophoresis* 23 (2002) 3078.
- [23] J. McCourt, G. Bordin, A.R. Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 990 (2003) 259.
- [24] A.A.M. Stolker, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 15.
- [25] M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi, *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 25.
- [26] Official Journal of the European Communities, L221, 8–36, Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002, Brussels, Belgium, 2002.
- [27] S.B. Hawthorne, Y. Yang, D.J. Miller, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2912.
- [28] S. Su, M. Chang, Ch. Lang, P. Chang, S. Chou, *J. Food Drug Anal.* 11 (2003) 114.
- [29] E.M. Golet, A. Strehler, A.C. Alder, W. Giger, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5455.
- [30] D.A. Volmer, B. Mansoori, S.J. Locke, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4143.

PREPARATION OF ANTIBODIES AND DEVELOPMENT OF A  
SENSITIVE IMMUNOASSAY WITH FLUORESCENCE DETECTION  
FOR TRIAZINE HERBICIDES

S. Herranz, J. Ramón-Azcón, E. Benito-Peña, M.D. Marazuela, M.P. Marco, M.C.  
Moreno-Bondi

*Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008) 1801–1812



## Preparation of antibodies and development of a sensitive immunoassay with fluorescence detection for triazine herbicides

Sonia Herranz · Javier Ramón-Azcón ·  
Elena Benito-Peña · María Dolores Marazuela ·  
María Pilar Marco · María Cruz Moreno-Bondi

Received: 20 November 2007 / Revised: 16 January 2008 / Accepted: 17 January 2008 / Published online: 23 February 2008  
© Springer-Verlag 2008

**Abstract** Specific polyclonal antibodies against *s*-triazine herbicides were obtained by preparing immunogens coupling home-synthesized haptens derivatives of simazine (6-chloro-*N*-ethyl-*N'*-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) to lysine groups of hemocyanin from keyhole limpets and bovine serum albumin carrier proteins. Three highly sensitive rabbit antisera were obtained and evaluated with a battery of six enzyme tracers derived from triazine structures in an optimized ELISA format. The antiserum As8 and the HRP-2f tracer, which yield the best assay sensitivity for simazine (detection limit  $0.11 \pm 0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $\text{IC}_{50}$   $0.88 \pm 0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ ), were applied to the development of a sensitive flow-through immunoassay for the analysis of this herbicide. The automated assay was based on a direct competitive immunosorbent assay and fluorescence detection. The optimized method presents an  $\text{IC}_{50}$  value of  $0.35 \pm 0.04 \mu\text{g L}^{-1}$  with a detection limit of  $1.3 \pm 0.9 \text{ ng L}^{-1}$  and a dynamic range from 0.010 to  $7.5 \mu\text{g L}^{-1}$  simazine. The generic nature of the antiserum was shown by good relative cross-reactivities with other triazines such as atrazine (420%) or propazine (130%) and a lower response to terbutylazine (6.4%) and desethyl-atrazine (2.2%). No cross-reactivity was obtained for non-related pesticides such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or

linuron and the assay could be applied as a screening method for triazine herbicides. The total analysis time was 30 min per determination and the immunosensor could be reused for more than 150 cycles without significant loss of activity. The immunosensor has been successfully applied to the direct analysis of simazine in surface water samples at the nanogram per liter level. The results obtained by comparative analysis of the immunosensor with a chromatographic procedure for triazines showed a close correspondence.

**Keywords** Triazines · Anti-simazine polyclonal antibodies · Flow-through immunoassay · Environmental analysis · Surface waters

### Abbreviations

ACN	acetonitrile
ATR	atrazine
BSA	bovine serum albumin
CPGA	controlled-pore glass covalently bound to protein A
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
DAD	diode-array detection
ET	enzyme tracer
FIIA	flow-injection immunoassay
GC	gas chromatography
HPLC	high-performance liquid chromatography
HPPA	3-( <i>p</i> -hydroxyphenyl)propanoic acid
HRP	horseradish peroxidase
KLH	hemocyanin from keyhole limpets
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
MS	mass spectrometry
NPD	nitrogen-phosphorous detection
PBS	phosphate-buffered saline
PBST	phosphate-buffered saline plus 0.2% Tween 20
RSD	relative standard deviation

S. Herranz · E. Benito-Peña · M. D. Marazuela ·  
M. C. Moreno-Bondi (✉)  
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry,  
Universidad Complutense de Madrid,  
28040 Madrid, Spain  
e-mail: mcmbondi@quim.ucm.es

J. Ramón-Azcón · M. P. Marco  
Applied Molecular Receptors Group (AMRG) IIQAB-CSIC  
CIBER of Bioengineering,  
Biomaterials and Nanomedicine Jordi Girona 18–26,  
08034 Barcelona, Spain



SIM	simazine
SPE	solid-phase microextraction
SPFIA	solid-phase fluorescence immunoassay

## Introduction

Triazine herbicides, e.g., atrazine (ATR), simazine (SIM), terbutylazine and propazine, are extensively used in agriculture to protect crops from undesirable broadleaf weeds by inhibiting photosynthesis. Triazines are registered in over 80 countries and save billions of dollars per year. However, they are persistent in the environment and have already been detected in soils [1], ground and surface waters [2], and also in tissues [3] and body fluids [4]. A European regulation has set a limit of  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  for individual pesticides in drinking water and  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  for the sum of pesticides in drinking water [5] and, thus, sensitive and reliable analytical methods, including screening methods, are required to comply with the legislation.

Current methods used to analyze pesticides in water and manure samples are mainly based on sample cleanup followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) or gas chromatography (GC)–tandem mass spectrometry (MS) detection or nitrogen–phosphorus detection (NPD) [6, 7]. These methods, although robust and well established, are time-consuming, expensive, require specialized personnel and make use of considerable amounts of toxic organic solvents [8]. Additionally, preliminary steps are usually required to preconcentrate large sample volumes in order to reach detectable amounts of the analytes [9].

Immunoassays, microbial inhibition tests and receptor assays have also been shown to be useful for the analysis of these pesticides in water, soil and food samples [10, 11]. Among the advantages of the immunoassays we can point out the high sensitivity and selectivity of antibodies which, in many cases, allows the direct detection of the target analytes in the buffered samples without further cleanup. A substantial number of methods developed to date for pesticide analysis are focused on triazine herbicides and based on enzymatic immunoassays [12–16]. Some of them make use of commercially available test kits [17] and the results show good correlation with those provided by chromatographic methods.

Many immunochemical techniques have been developed for the sensitive detection of ATR in real samples. As an example, anti-ATR antibodies produced by Gascón et al. [18] have been used for the development of a microplate-based ELISA, a flow-injection immunoassay (FIIA) [18–20] a field-test kit (SensioScreen® TR500) [21] and optical (surface plasmon resonance) [22] and electrochemical

(amperometric) [23] immunosensors and impedimetric immunosensors [24, 25]. Other examples of immunochemical methods of analysis against ATR [14, 26–29] or pesticide immunoarrays including triazines [30, 31] have been reported.

Anti-ATR antibodies have also been applied to the development of immunoassays for SIM, another important triazine which has also been extensively used in agriculture [32, 33], for control of broad-leaved and grassy weeds on a variety of deep-rooted crops (vineyards, olive groves) and on noncrop areas such as farm ponds and fish hatcheries. Nevertheless, these assays usually show a poor cross-reactivity for SIM (5–20%), and the sensitivities of the immunoassays for the analysis of this herbicide are still lower than those for ATR ( $\text{IC}_{50, \text{SIM}} = 0.48 \mu\text{g L}^{-1}$  [18],  $3.1 \mu\text{g L}^{-1}$  [34] or  $7.9 \mu\text{g L}^{-1}$  [35]). In fact, to our knowledge, only a few anti-SIM antibodies have been designed and synthesized in the past few years, with limited success, especially in terms of sensitivity [36, 37].

In comparison with batch ELISA methods, FIAs and immunosensors [20, 38] allow the automated and unattended evaluation of a large number of samples in short times [39]. In direct flow-through solid-phase fluorescence immunoassays (SPFIAs) the analyte and a constant amount of a labeled derivative compete for the antibody binding sites. After competition, the immunocomplexes are retained on an immunosorbent packed in a reactor and the amount of labeled antigen bound to the antibody is measured by different techniques and can be related to the antibody concentration in the sample. After detection has taken place, the immunosorbent can be regenerated by the application of a desorbent solution that washes out the antigen–antibody complexes without affecting the characteristics of the support.

This paper describes the preparation of specific antisera for SIM that have been characterized using ELISA and SPFIA methods. In the latter, the triazine herbicide competes with a horseradish peroxidase (HRP) labeled SIM derivative for the binding sites of the novel anti-SIM antibodies. The assay is based on the oriented capture of the immunocomplexes formed in solution in an immunoreactor containing controlled-pore glass covalently bound to protein A (CPGA; ProSep-A® medium). Several parameters affecting the immunosensor performance have been optimized, such as the assay pH, antibody and labeled antigen concentration, flow rate, the nature of the immunosupport, incubation time for the immunological reaction, and the concentration of the enzyme substrates. The immunosensor has been applied to the analysis of SIM in surface water samples and validated by comparison with two reference chromatographic methods.

## Experimental

### Reagents and materials

Analytical grade PESTANAL® (Riedel-de Haën) herbicides, such as SIM, ATR, terbutylazine, propazine, hydroxyl-atrazine, desethyl-desisopropyl-atrazine, desisopropyl-atrazine, desethyl-atrazine and linuron, were provided by Sigma (St. Louis, MO, USA). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) was from Aldrich (Steinheim, Germany). The chemical structures of the *s*-triazines and the nonrelated pesticides included in the study are shown in Figs. 1 and 2.

Linuron, 2,4-D and hydroxyl-atrazine stock solutions were prepared in MeOH (1 mg mL<sup>-1</sup>), acetonitrile (ACN; 1 mg mL<sup>-1</sup>) and 20 mM phosphoric acid (pH 3.0, 1 mg mL<sup>-1</sup>), respectively. The stock solutions of the other herbicides were prepared in dimethyl sulfoxide (1 mg mL<sup>-1</sup>) and all of them were stored in the dark at 4 °C. SIM standard solutions for immunoassay calibration purposes were prepared daily by dilution of the stock solutions in phosphate-buffered saline (PBS) (20 mM, pH 8.0).

Water was purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). MeOH (HPLC grade) and acetonitrile (HPLC grade) were supplied by SDS (Peypin, France) and dimethyl sulfoxide (pro analysi grade) was from Scharlau (Barcelona, Spain). All other chemicals used were of analytical reagent grade.

Proteins, enzymes and immunochemicals were provided by Sigma (St. Louis, MO, USA). 3-(*p*-Hydroxyphenyl) propanoic acid (HPPA), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide, used as revealing agents for the enzymatic reactions in ELISA and flow immunoassay methods, were supplied by Aldrich (Steinheim, Germany).

The immunosorbent Ultralink® immobilized protein A/G plus was purchased from Pierce (Madrid, Spain). ProSep®-A medium (CPGA) was from Millipore (Bedford, MA, USA).

These supports were able to specifically and reversibly bind all immunoglobulin G subclasses of rabbit immunoglobulins through their Fc domains.

### Instrumentation

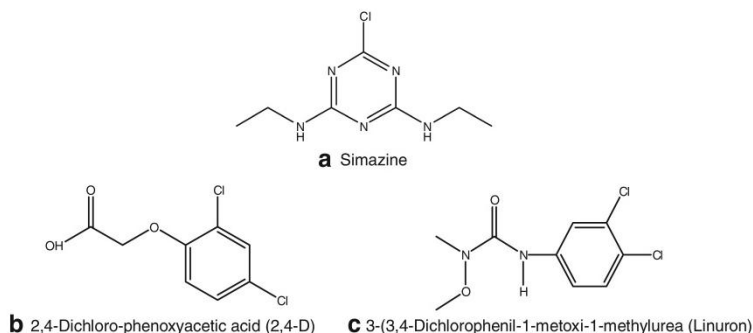
#### Enzyme-linked immunosorbent assay

Microtiter-plate ELISA analyses were performed on 96-well polystyrene microtiter plates from NUNC (Maxisorb, Roskilde, Denmark). Ninety-six-well polystyrene plates for mixing and to prepare dilutions and calibration curves were used. The absorbance values were read at 450 nm in a microtiter-plate ELISA Titertek Multiskan plus mark II instrument (Labsystems, Helsinki, Finland). For data acquisition and processing, the commercial software package Genesis (Labsystems) was employed. ELISA plates were washed with an automatic washer, model SLT 96PW (Salegurb, Austria).

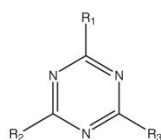
#### Flow-through immunosensor

The experimental set-up for the assay has been described previously [40]. Briefly, an eight-way distribution valve (Kloehn, Las Vegas, NV, USA) equipped with a 2.5-mL syringe pump was connected to another eight-way distribution valve for program-assisted uptake and delivery of all immunoreagents and samples into the flow-through system. The whole system was controlled with the pump software provided by the manufacturer (Kloehn, Las Vegas, NV, USA). One channel of the eight-way distribution valve was connected to a homemade poly(methyl methacrylate) reactor (10 mm×6 mm), thermostatted at 22 °C, packed with CPGA (ProSep®-A). Finally, the reactor was connected to a flow-through cell (100 µL, Starna, Germany) placed in the spectrofluorometer sample compartment. Fluorescence intensity measurements ( $\lambda_{\text{exc}}$ =320 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ =405 nm) were

**Fig. 1** Chemical structures of **a** simazine (SIM), **b** 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and **c** linuron



**Fig. 2** Chemical structures of some *s*-triazines, their metabolites and haptens used as enzyme tracers (ETs)



(A) Triazine

Compound	R1	R2	R3
<b>SIM</b>	Cl	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>ATR</b>	Cl	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>Propazine</b>	Cl	NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>Terbutylazine</b>	Cl	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
<b>Desisopropylatrazine</b>	Cl	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>
<b>Desethylatrazane</b>	Cl	NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>
<b>Desisopropyl-desethylatrazine</b>	Cl	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>
<b>Hydroxyatrazine</b>	OH	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>2a</b>	Cl	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH
<b>2b</b>	Cl	NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH
<b>2c</b>	Cl	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH
<b>2e</b>	Cl	NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH
<b>2f</b>	Cl	NH-cyclopropyl	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH
<b>4b</b>	S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>4e</b>	SCH <sub>3</sub>	NH-cyclopropyl	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH

carried out using a spectrofluorometer (Fluoromax 2, Horiba Jobin Yvon, Longjumeau Cedex, France) controlled with the original software (Datamax). All the solutions were thermostatted at 22 °C using a water bath, Polyscience® 9015 (IL, USA).

#### Immunoreagents

##### Synthesis of the haptens

The preparation of the haptens **2b**, **2c**, **2e**, **2f**, **4b** and **4e** was carried out following the procedure described by Ballesteros et al. [34, 35] and Gascón et al. [18]. The chemical structures of the synthesized haptens described in this paper are collected in Fig. 2.

##### Conjugation to carrier proteins

**Immunogen and coating antigens** The syntheses of the immunogen and antigen coating were carried out using the mixed anhydride method [35] which allows the covalent linking of hapten **2c** to hemocyanin from keyhole limpets (KLH) and bovine serum albumin (BSA). Briefly, tri-*n*-butylamine (4 µL, 16.5 µmol) and isobutylchloroformate (3 µL, 18 µmol) were sequentially added to the carboxylic

acid hapten (15 µmol) dissolved in an ice bath of cooled anhydrous dimethylformamide (160 µL). The resulting mixture was divided in two equivalent fractions and added dropwise to a solution of each protein (30 mg each) in 0.2 M borate buffer (1.8 mL at pH 8.7).

The conjugates obtained, **2c**-KLH and **2c**-BSA, were extensively dialyzed and, finally, lyophilized and stored at −80 °C. Stock solutions of 1 mg mL<sup>−1</sup> were prepared with PBS and stored in aliquots at −20 °C.

**Enzyme tracers** Haptens **2b**, **2c**, **2e**, **2f**, **4b** and **4e** were prepared as described by Gascón et al. [18] by the active ester method. The haptens (60 µmol) were reacted with freshly prepared solutions of *N*-hydroxysuccinimide (8.62 mg, 75 µmol) and dicyclohexylcarbodiimide (30.90 mg, 150 µmol) in anhydrous dimethylformamide (200 µL) for about 2 h at room temperature until the appearance of the urea precipitate, which was removed by centrifugation. The supernatant of each solution was split in four and then added dropwise to the HRP (2 mg) solutions in 0.2 M borate buffer (1.8 mL) and stirred for 4 h at room temperature and overnight at 4 °C. The conjugates were extensively dialyzed and eventually stored frozen at −20 °C in small aliquots. Working solutions were stored at 4 °C.



### Hapten density analysis

The hapten density of **2c**-BSA was determined spectrophotometrically by measuring ratios of the absorbance at 260 and 280 nm of 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  solutions according to the following equation:

$$n = \left( \varepsilon_{p,280} / \varepsilon_{H,260} \right) \times \left[ \left( A_{260} / A_{280} \right) - \left( \varepsilon_{p,260} / \varepsilon_{H,280} \right) \right],$$

where  $\varepsilon_H$  is the specific absorbance of the hapten and  $\varepsilon_p$  is the specific absorbance of the protein.  $\varepsilon_{p,260}$ ,  $\varepsilon_{H,260}$  and  $\varepsilon_{p,280}$  were calculated by measuring the absorbance at 260 nm of solutions of the free haptens (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and proteins (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and the absorbance at 280 nm of the solution of the proteins.

The hapten density of **2c**-BSA was also determined by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) MS by comparing the molecular weight obtained for the standard BSA and that of the conjugates. MALDI spectra were obtained by mixing 1  $\mu\text{L}$  of the matrix solution [*trans*-3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, 10  $\text{mg mL}^{-1}$  in ACN/water (0.1% trifluoroacetic acid) (70:30, v/v)] with 0.5  $\mu\text{L}$  of a solution of the conjugates or proteins [1  $\text{mg mL}^{-1}$  in ACN/water (0.1% trifluoroacetic acid) (70:30, v/v)].

### Immunization of the rabbits

Female New Zealand white rabbits (7, 8 and 9) weighing 2–4 kg were immunized with **2c**-KLH according to the immunization protocol already described [18]. Evolution of the antibody titer was controlled by measuring the binding of serial dilutions of the antisera to microtiter plates coated with **2c**-BSA. Antiserum was obtained by centrifugation and was stored at  $-80^\circ\text{C}$  in the presence of 0.02%  $\text{NaN}_3$ .

### ELISA development

#### Screening of the antisera and enzyme tracers

The avidity of each antiserum for the different enzyme tracers (ETs) was determined by measuring the binding serial dilutions (1  $\mu\text{g L}^{-1}$  to 8  $\text{ng L}^{-1}$ , 50  $\mu\text{L}$  per well) of the ETs **2b**-HRP, **2c**-HRP, **2e**-HRP, **2f**-HRP, **4b**-HRP and **4e**-HRP (1 h at room temperature) to microtiter plates coated (overnight,  $4^\circ\text{C}$ ) with different dilutions of each sera (1:1,000 to 1:64,000, 100  $\mu\text{L}$  per well). Optimal concentrations for ETs and antisera were chosen to produce absorbances of 0.2–1.0 units in 30 min. With these concentrations, the ability of the analyte SIM to compete with ETs for the antibody binding sites was investigated. These experiments were carried out by adding serial dilutions of the analyte [0.064–2,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  in PBS plus

0.2% Tween 20 (PBST), 50  $\mu\text{L}$  per well] and the ETs (appropriately diluted in PBST, 50  $\mu\text{L}$  per well) to the antisera-coated plates.

#### Optimized competitive ELISA

Microtiter plates were coated with the antiserum in coating buffer (As8, 1:4,000, 100  $\mu\text{L}$  per well) overnight at  $4^\circ\text{C}$ , covered with adhesive plate sealers. The following day, the plates were washed four times with PBST (300  $\mu\text{L}$  per well).

Serial dilutions of SIM (0.064–2,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  in PBST) were added to the coated plate (50  $\mu\text{L}$  per well) and incubated for 30 min at room temperature. The plates were washed as described before and the substrate solution was added (100  $\mu\text{L}$  per well). The substrate solution contained 0.01% 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and 0.004%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in citrate buffer. Citrate buffer was a 0.04 M solution of sodium citrate, pH 5.5. The enzymatic reaction was stopped after 30 min at room temperature with 50  $\mu\text{L}$  of 4 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , and the absorbances were read at 450 nm.

The normalized response was plotted as a function of the analyte concentration (on a logarithmic scale), and the experimental data were fitted to a four-parameter logistic equation:

$$\text{Normalized signal} = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + \left( \frac{[\text{analyte}]}{\text{IC}_{50}} \right)^b} + A_{\min}, \quad (1)$$

where  $A_{\max}$  is the asymptotic maximum (maximum emission in the absence of analyte),  $b$  represents the slope of the curve at the inflection point,  $\text{IC}_{50}$  is the concentration of the analyte at the inflection point (concentration giving 50% inhibition of  $A_{\max}$ ) and  $A_{\min}$  is the asymptotic minimum. The detection limit was calculated as the analyte concentration for which the tracer binding to the antibody was inhibited by 10% [41], and the dynamic range of the method was evaluated as the analyte concentrations that produced a normalized signal in the 20–80% range.

#### Flow-through immunosensor assay protocol

The measuring protocol was based on the principles of a competitive direct enzyme immunoassay, where the analyte (antigen SIM) competes with a HRP-labeled SIM derivative (labeled antigen **2f**-HRP) for a limited number of receptor binding sites (antibody As8). The assay solutions were prepared in the carrier solution, PBS 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 8.0. Initially, the sample (0.7 mL) was mixed in the syringe with a constant amount (0.2 mL) of ET and antibody (0.2 mL). After 4 min, the mixture (1 mL) was injected into the immunoreactor at a flow rate of 0.5  $\text{mL min}^{-1}$  to allow the retention of the immunocomplexes by the immunosorbent.

The reactor was washed four times with 1.5 mL PBS to remove all the unbound complexes. Solutions of fluorogenic enzyme substrate HPPA (0.3 mL,  $1.5 \text{ g L}^{-1}$ ) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.2 mL, 0.025%) in PBS were mixed in the syringe and 0.2 mL was injected into the reactor. After 5 min, the fluorescent product generated from the enzymatic reaction was driven through a flow-through cell placed in the fluorometer by injecting 2.5 mL PBS at  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . After peak registration, the immunocomplexes were desorbed from the immunosorbent by passing them through 2.5 mL of 0.1 M glycine/HCl, pH 2.0 at  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ .

Before a new measurement was made the reactor was washed with PBS ( $2.5 \text{ mL}$ ,  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ ). A complete cycle for the whole automated assay procedure required approximately 30 min including regeneration. The immunoreactor showed great stability and the system could be used for more than 150 measurements. The reactor was stored at  $4^\circ\text{C}$  when not used. The optimized protocol, based on the principles of competitive direct enzyme immunoassay, is shown in Table 1.

Experimental signals were normalized using the following expression:

$$\text{Normalized response} = (B - B_\infty)/(B_0 - B_\infty), \quad (2)$$

where  $B$  is the signal (intensity of fluorescence) measured in the presence of increasing analyte concentrations,  $B_\infty$  is the background fluorescence obtained in the presence of an excess of SIM and  $B_0$  is the signal in the absence of the pesticide. The normalized response was plotted as a function of the analyte concentration (on a logarithmic scale), and the experimental data were fitted to a four-parameter logistic equation (sigmoidal) (see Eq. 1).

**Table 1** Scheme of the assay protocol in the flow-injection immunoassay (FIIA)

Step	Event
1	Mixing sample (700 $\mu\text{L}$ ) with enzyme tracer solution (200 $\mu\text{L}$ ) and Ab solution (200 $\mu\text{L}$ )
2	Incubation in syringe for 4 min
3	Injection of 1 mL mixture at $0.5 \text{ mL min}^{-1}$
4	Reactor washing with $4 \times 1.5 \text{ mL}$ PBS at $0.5 \text{ mL min}^{-1}$
5	Mixing HPPA (300 $\mu\text{L}$ , $1.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) with $\text{H}_2\text{O}_2$ (200 $\mu\text{L}$ , 0.025 %, v/v)
6	Injection of 200 $\mu\text{L}$ mixture. Incubation for 5 min
7	Reactor washing with 2.5 mL buffer at $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Peak registration
8	Desorption with 2.5 mL 0.1 M glycine/HCl pH 2.0 solution at $0.5 \text{ mL min}^{-1}$
9	Reactor washing with 2.5 mL PBS at $2 \text{ mL min}^{-1}$

Ab antibody, PBS phosphate-buffered saline, HPPA 3-(*p*-hydroxyphenyl)propanoic acid

## Selectivity studies

Cross-reactivity studies were carried out by measuring the competitive curves for other chemically related and non-related pesticides under the optimized conditions. Cross-reactivity was calculated as the percentage between the  $\text{IC}_{50}$  value for SIM and the  $\text{IC}_{50}$  value for the interfering compound according to the following equation:

$$\% \text{CR} = \frac{\text{IC}_{50}(\text{SIM})}{\text{IC}_{50}(\text{cross} - \text{reacting compound})} \times 100, \quad (3)$$

where %CR is the percentage of cross-reactivity.

## Sample analysis and validation

River and tap water samples were collected in 2.5-mL amber glass bottles, rinsed with ultrapure water and stored at  $4^\circ\text{C}$  until measurement. River water samples were collected from the Eresma River (Segovia, Spain). The samples were filtered through a  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  filter (Whatman, Maidstone, UK) to remove suspended matter and the pH was adjusted to 8.0 using PBS to a final buffer concentration of 10 mM. The samples were also checked to exclude the presence of naturally contaminating herbicides and were spiked with increasing concentrations of SIM to evaluate the matrix effect on the FIIA.

Additionally, SIM-fortified river water samples (A, B and C) (expected values between 10 and  $400 \text{ ng L}^{-1}$ ), provided by a certified independent laboratory specialized in environmental analysis, were analyzed using the optimized FIIA. All the analyses were carried out in quintuplicate.

For validation purposes, the samples were analyzed by HPLC with UV-vis detection (diode-array detection, DAD) and GC with NPD after solid-phase extraction (SPE) and preconcentration. SPE cartridges (Oasis HLB from Waters, Barcelona, Spain) were preconditioned with 10 mL MeOH and 10 mL Milli-Q water. Five hundred milliliters of sample was percolated, at  $5 \text{ mL min}^{-1}$ , following a washing step with 10 mL Milli-Q water. The analytes were eluted with a mixture of 10 mL MeOH and 5 mL dichloromethane. Finally, the extract was evaporated to dryness, under a nitrogen stream, and extracts were reconstituted in 500  $\mu\text{L}$  MeOH (1 mL isooctane, for GC analysis), filtered by a  $0.22\text{-}\mu\text{m}$  nylon membrane and 10  $\mu\text{L}$  was injected into the HPLC system (1  $\mu\text{L}$  in GC analysis).

Chromatographic analysis via HPLC-DAD was carried out with an HP 1100 series liquid chromatograph from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, an autosampler, an automated injector and a diode-array detector. The analytical column was a ZORBAX™  $\text{C}_{18}$  (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) column from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). A gradient program was used for the mobile phase, combining solvent



A (Milli-Q water) and solvent B (ACN) as follows: 0% solvent B (5 min), 0–50% solvent B (25 min). Analyses were performed at a flow rate of  $0.42 \text{ mL min}^{-1}$  and the column temperature was kept at  $45^\circ\text{C}$ . The injection volume was  $10 \mu\text{L}$  and all the compounds were eluted within 24 min. The UV detector wavelength was set at 225 nm. Quantification was performed using external calibration and peak area measurements. All the analyses were carried out in triplicate.

Chromatographic analysis via GC-NPD was carried out with an HP 6890 series gas chromatograph from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipped with a NPD detector, an autosampler and a split-splitless injector. Separation was performed on an HP-5 ( $30 \text{ m} \times 0.32\text{-mm}$  inner diameter) capillary column containing 5% diphenyl–95% dimethylsiloxane (film thickness  $0.25 \mu\text{m}$ ) from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). The injector and detector were operated at 225 and  $300^\circ\text{C}$ , respectively. The sample ( $1 \mu\text{L}$ ) was injected and the oven temperature was programmed as follows:  $71^\circ\text{C}$  (1 min),  $71\text{--}200^\circ\text{C}$  (12 min) and holding for 3 min. Helium at a constant flow rate of  $1.6 \text{ mL min}^{-1}$  was used as the carrier. Hydrogen and air were used as detector gases at 3 and  $60 \text{ mL min}^{-1}$ , respectively. Quantification was performed using external calibration and peak area measurements.

## Results and discussion

### Preparation of the hapten and the protein conjugates

The key step to produce antibodies against SIM is the preparation of an appropriate immunizing hapten, since it is not an immunogenic substance. The hapten should preserve as much as possible the properties of the target substance. Thus, this involves performing theoretical studies to identify the most important antigenic epitopes on each molecule using computer-assisted molecular engineering tools in order to preserve and mimic, as much as possible, the original

features (geometry, conformation, electronic distribution, physicochemical properties, etc.) of the target analyte.

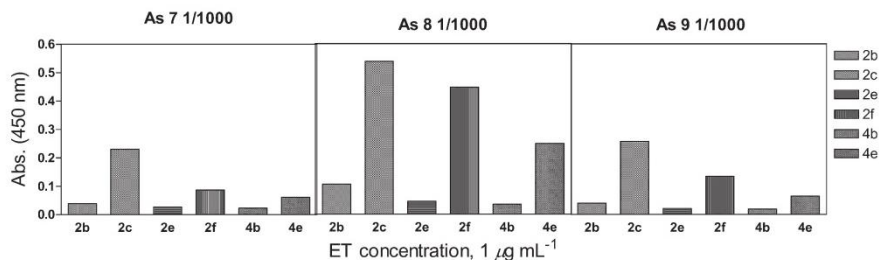
Antibodies were prepared later, after conjugation of these haptens to macromolecules in order to make them immunogenic, by application of the appropriate immunization protocol. According to this, and considering the results reported by Goodrow et al. [42], we chose hapten **2c** to raise antibodies (Fig. 2). The location of the spacer arm, possessing an appropriate functional group at the distal end, was selected to maximize recognition of the SIM structure. This hapten has a C6 spacer that mimics the ethyl group of SIM. At the same time, important antigenic determinants in the SIM chemical structure such as the ethylamino group and the electronegative chlorine atom remain far away from the shielding effect caused by the protein.

Rabbits 7, 8 and 9 were immunized with hapten **2c** attached covalently to KLH. The hapten density of KLH conjugates is difficult to calculate because of the great molecular size of this protein. However, since BSA conjugates were prepared simultaneously, we used them to verify conjugation. Hapten-to-BSA ratios of 3.16 and 4.2 were obtained from UV absorbance and MALDI measurements, respectively.

The fact that heterologous immunoassays provide more sensitive assays has frequently been reported [43]. For this purpose we prepared a battery of ETs using the SIM carboxylic acid haptens **2b**, **2e**, **2f**, **4b** and **4e** (Fig. 2).

### Screening of the avidity of the antisera

The serum of each animal was tested against **2c**-BSA on an indirect ELISA format, after every bleeding, until no increase in the titer was observed. Once the bleeding had reached an acceptable antibody titer, the animals were exsanguinated and the antisera were tested with a battery of the different SIM-ET (Fig. 2). The avidity was tested using noncompetitive ELISA formats. The results of these experiments are collected in Fig. 3. It can be observed that As8 showed the best response.



**Fig. 3** Results from the antibody titration experiments performed using all antisera generated after immunization versus different ETs (**2b**, **2c**, **2e**, **2f**, **4b** and **4e**). Direct ELISA format, antisera (As) 1:1,000 (v/v), ET  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$

## Development of competitive ELISAs

Those antiserum and ET (direct ELISA format) combinations showing acceptable titers ( $A_{\max} > 0.2$  units; antisera dilution more than 1:1,000; ET concentration less than  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were further investigated to test recognition of the SIM pesticide in solution. Table 2 shows those assays with  $\text{IC}_{50}$  values lower than  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  using a direct ELISA configuration. Repetitive experiments using the best assays obtained with each set of antisera, demonstrated that the As8/ET 2f-HRP combination showed the best response and the best  $\text{IC}_{50}$  value.

## Features of the ELISAs

The features of the assay carried out under the established conditions are collected in Table 3. The limit of detection (concentration producing 90% of the  $A_{\max}$ ) accomplished by the ELISA was  $0.11 \pm 0.02 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{IC}_{50}$   $0.88 \pm 0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ ). The relative standard deviation (RSD) within the assay was 4% and that between assays performed on different days was 6%, demonstrating the immunoassay reproducibility.

## Sensor optimization and characterization

Several parameters affecting the performance of the FIAA were evaluated: the nature of the support, assay pH, concentration of antibody and tracer, the incubation time for the immunological and enzymatic reactions and the concentration and nature of the enzyme substrates. The flow immunoassay was developed using the combination of antibody and ET that yielded the best results in the ELISA tests, with respect to sensitivity and reproducibility (Table 2).

## Immunoagent optimization

The detection of the ET was carried out using HPPA as a fluorogenic substrate and  $\text{H}_2\text{O}_2$  as an oxidant. Previously, a novel commercial fluorogenic substrate (QuantaBlu™ NS/K, Pierce, UK) was tested for assay development. The fluores-

**Table 3** Features of the optimized immunoassays

	ELISA	FIAA
$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$0.88 \pm 0.04$	$0.35 \pm 0.04$
Detection limit ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$0.11 \pm 0.02$	$0.0013 \pm 0.0009$
Dynamic range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.24 to 3.64	0.01 to 7.53
$R^2$	0.99	0.99

The parameters were calculated using the four-parameter equation to fit the experimental data. Confidence limit  $\pm ts/\sqrt{n}$  (95%,  $n=6$ )

cence signals [ $B_0$  250 ng  $\text{mL}^{-1}$  of labeled antigen, antibody dilution 1:1,000, (v/v)] obtained with the QuantaBlu™ NS/K substrate were higher than for HPPA, but the response was highly irreproducible (RSD > 40%) and consequently the latter was selected as the enzyme substrate.

To optimize the detection step, labeled antigen conjugate and antibody concentrations were kept constant [ $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  and antibody dilution 1:2,000 (v/v), respectively] and various concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and HPPA were assessed for maximal fluorescence intensity values. HPPA and  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations were evaluated over the ranges from 0.5 to 3.0 mg  $\text{mL}^{-1}$  and from 0.0015 to 0.1%, respectively. Maximum signal was achieved for 1.5 mg  $\text{mL}^{-1}$  HPPA. The fluorescence signal increased with  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations up to 0.025%. Higher concentrations yielded a slight decrease in the fluorescence intensity, after which it remained constant.

The effect of the buffer solution pH (0.010 M PBS) on the sensitivity of the flow-through immunoassay was tested over the range from 7.0 to 9.0. The fluorescence signal increased with pH up to 8.0, after which it remained constant, so this value was selected for further measurements.

## Nature of the immunosupport and reusability

Two different supports were tested to evaluate the effect of the nature of the immunosorbent on the retention of the immunocomplexes: CPGA (ProSep®-A) and protein A/G covalently bound to an azlactone-activated polymeric material (Ultralink® immobilized protein A/G plus). The sorbents were packed into a reactor (10 mm×4 mm), and

**Table 2** Immunoassay features of the different competitive ELISAs

Antiserum	Enzyme tracer	$A_{\max}$	$A_{\min}$	$\text{IC}_{50}$	Slope	$R^2$
As7	2f-HRP	0.18	0.01	3.6	-1.1	0.95
As8	2c-HRP	0.20	0.01	5.6	-1.0	0.92
	2f-HRP	0.67	0.01	3.0	-1.1	0.98
As9	2c-HRP	0.25	0.004	4.4	-1.1	0.96
	2f-HRP	0.31	0.01	3.8	-1.2	0.96

Only those assays showing reasonable parameters and  $\text{IC}_{50}$  values below  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  are shown. The values were calculated from the four-parameter equation used to fit the standard curves.  $\text{IC}_{50}$  values are expressed in micrograms per liter

HRP horseradish peroxidase

the long-term response in the absence of SIM ( $B_0$ ) was measured using constant ET and antibody concentrations [ $B_0$  250 ng mL<sup>-1</sup> of labeled antigen, antibody dilution 1:400, (v/v)]. Higher signal and better reproducibilities were obtained when CPGA was used as the immunosorbent (RSD < 3.8%,  $n=12$ ); thus, this material was selected for further experiments. Moreover, the reactor could be reused for more than 150 assay cycles with no detectable loss of activity.

#### Immunosensor optimization and analytical characterization

Antigen–antibody (labeled antigen–antibody) interactions are mainly based on electrostatic forces, hydrogen bonds and van der Waals forces that can be greatly affected by the pH, concentration and ionic strength of the measuring solutions.

The effect of the buffer composition on the analytical signal was studied using phosphate buffer, PBS and PBST (pH 8.0) as carrier solutions. PBS (RSD=4.8%,  $n=3$ ) provided better results, in terms of reproducibility and sensitivity than phosphate buffer (RSD=13.3%,  $n=3$ ). The higher response obtained in PBS can be attributed to the presence of cations with small ionic radius, such as Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup>, which allow a closer interaction between the epitope and the paratope, enhancing the immunoreaction yield and increasing the stability of the immunocomplex [44]. The presence of detergent (PBST) did not improve the immunoassay performance.

The buffer concentration was evaluated in the range from 0 to 0.100 M. In the absence of salts, a drastic decrease in the fluorescence signal was observed, both in the presence and in the absence of herbicide. These results agree with the hypothesis that a decrease in the salt concentration causes an increase in the distance between the epitope and the paratope, preventing the formation of van der Waals bonds that consolidate immunobinding after primary recognition [45].

The  $B/B_0$  ratio, for 0.4 µg L<sup>-1</sup> SIM, increased for PBS concentrations up to 0.010 M (RSD < 4.1%,  $n=3$ ), which was selected for further measurements. Values higher than 0.020 M yielded slightly lower and worst reproducibilities (RSD > 8.3 %,  $n=3$ ).

The incubation time of the immunoreagents has a direct effect on the analytical signal. This parameter was evaluated over the 0–5-min range. The fluorescence signal in the absence ( $B_0$ ) and in the presence ( $B$ ) of 0.4 µg L<sup>-1</sup> SIM increased with the incubation time up to 4 min, and then remained constant (maximum assay time 6 min). The enzyme reaction time also influenced the analytical signal. A contact time of 5 min between the substrates and the ET was selected, as longer values did not render better sensitivities.

The amount of antibody and tracer (labeled antigen) applied in the assay should be kept low enough to achieve good sensitivity, but must be sufficient to provide an acceptable signal. The best results were obtained for an antibody dilution of 1:1,000 (v/v) and labeled antigen concentration of 250 ng mL<sup>-1</sup>. Optimized conditions for the analysis of SIM using the flow-through immunoassay are collected in Table 4.

The normalized competition curve obtained for SIM standards in PBS at concentrations ranging from 0 to 1,000 µg L<sup>-1</sup> is depicted in Fig. 4. The IC<sub>50</sub> value was 0.35±0.04 µg L<sup>-1</sup> and the limit of detection was 1.3±0.9 ng L<sup>-1</sup>. The dynamic range of the immunoassay (normalized signal in the 20–80% range) was from 0.010 to 7.5 µg L<sup>-1</sup>.

The sensitivity of the immunosensor for SIM was far superior to that reported for the direct optimized ELISA and the detection limit compares favorably with [46] or is even lower than [12, 18, 47, 48] that for other immunoassays or immunosensors described in the literature. The detection limit described by Tudorache et al.[49, 50] using a micro immunosupported liquid membrane assay or a magnetic particle based immunosupported liquid membrane is 1 or 2 orders of magnitude lower, respectively. However, as the authors point out, the sensitivity of these assays might be susceptible to interferences and their application to analysis of real samples should be improved.

The intraday RSD ( $n=4$ ) was below 10% in the calibration range. Interday reproducibility was evaluated by measuring the calibration standards on different days ( $n=5$ ). RSDs below 13% were obtained in this case.

#### Cross-reactivity

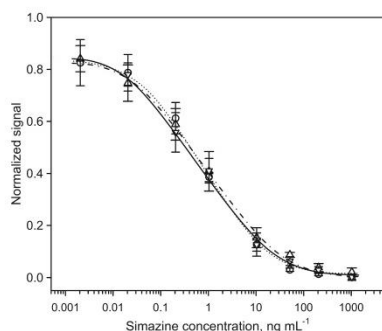
Cross-reactivity was calculated as a percentage for the ratio between the IC<sub>50</sub> value for SIM and the IC<sub>50</sub> value for the interfering compound. The results are shown in Table 5.

**Table 4** Optimized operating conditions for the analysis of simazine (SIM) using the automated immunosensor

Parameter	Optimized value
Incubation time Ab + Ag/Ag* (min)	4
Antibody dilution factor (v/v)	1:1,000
Enzyme tracer concentration (ng mL <sup>-1</sup> )	250
Carrier solution	PBS, pH 8.0, 0.010 M
HPPA concentration (mg mL <sup>-1</sup> )	1.5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentration (%)	0.025
Incubation time HPPA–H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (min)	5
Regeneration solvent	Glycine/HCl (pH 2)
Immunosupport	ProSep®-A
Total analysis time (minutes per sample)	30

Ag antigen, Ag\* labeled antigen





**Fig. 4** Competitive calibration curves obtained with the immunosensor for SIM standard solutions in 0.010 M phosphate-buffered saline at pH 8.0 (up triangles), SIM standard solutions in tap water (down triangles) and SIM standard solutions prepared in river water (circles). The experimental points have been fitted to Eq. 1 ( $n=9$ )

The polyclonal antibodies tested showed some group specificity; in addition, the relative cross-reactivity was most pronounced for other *s*-triazines, such as ATR (420%) and propazine (130%) meeting the concentration levels set by the European Union for drinking water.

The high cross-reactivity obtained with ATR could be explained considering that this compound has a free chloride and an ethyl group in its structure, which were also present in the hapten used for growing antiserum As8. In the case of propazine, the high cross-reactivity could be explained considering that the 6C- handle of the **2c** hapten mimics an “extended” ethylamino group. Moreover, as pointed out previously, the affinity of the antibody is usually higher for an analyte that has one carbon atom more than the immunogen or is more branched than the immunogen at the same position, as happens for propazine and ATR. This phenomenon has also been described by other authors for anti-SIM and anti-ATR polyclonal antibodies [18, 46, 51].

**Table 5** Cross-reactivity for some *s*-triazines and other pesticides with the SIM immunosensor

Compound	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cross-reactivity (%)
SIM	0.35	100
Atrazine	0.09	420
Propazine	0.29	130
Terbutylazine	5.93	6
Desisopropyl-atrazine	74.85	0.5
Desethyl-atrazine	17.27	2
Hydroxyatrazine	> 90.00	< 0.4
Desisopropyl-desethyl-atrazine	NC	NC
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	NC	NC
Linuron	NC	NC

NC no competition

Surprisingly, no recognition was obtained for desisopropyl-atrazine (0.5%), desethyl-atrazine (2%) and desisopropyl-desethyl-atrazine (no competition), even though the isopropylamino and the ethylamino group are also present in their structures. According to Gascón et al. [18], these lower or zero cross-reactivities can be attributed to the presence of a free amino group that can interfere in the formation of the antigen–antibody immunocomplex. Furthermore, the low cross-reactivity of hydroxyl-atrazine (less than 0.4%) could be attributed to the lack of the chloride group (-OH instead) that seems to be essential for the good recognition of the *s*-triazines with this antibody. Nonrelated pesticides, such as 2,4-D and linuron, were not recognized by the antibody.

#### Analysis of surface water samples

Immunoassays are known to suffer from matrix effects, owing to nonspecific binding, denaturation of antibody and enzyme, etc., thus resulting in false-positive responses [52]. River and tap water samples were spiked with increasing concentrations of SIM, in the range 0–1,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , and were analyzed using the optimized FIIA in order to investigate the presence of a matrix effect. The samples had been checked previously and contained undetectable levels of the herbicides. The comparison of the dose-calibration curves obtained in the different samples and in Milli-Q water (Fig. 4) showed no statistically significant differences. Thus, the immunosensor developed allowed the direct analysis of the triazines in buffered surface waters at the low nanogram per liter level.

SIM-fortified river water samples were analyzed using the FIIA and the results are collected in Table 6. For validation purposes the samples were also analyzed by GC-NPD and HPLC-DAD (Table 6). No significant differences were obtained (confidence level 95%) in any of the samples tested, demonstrating the excellent performance of the optimized immunosensor in comparison with the HPLC-DAD and GC-NPD methods. Moreover, the FIIA allows the direct analysis of environmental waters without the need of further cleanup and preconcentration.

**Table 6** Analysis of SIM in water samples using the immunosensor developed ( $n=5$ )

Sample	FIIA ( $\text{ng L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	SPE/GC-NPD ( $\text{ng L}^{-1}$ )	SPE/HPLC-DAD ( $\text{ng L}^{-1}$ )
A	19±8	22±3	18±10
B	59±8	58±7	60±9
C	111±10	117±14	112±12

SPE solid-phase extraction, GC gas chromatography, NPD nitrogen-phosphorous detection, HPLC high-performance liquid chromatography, DAD diode-array detection

<sup>a</sup> Confidence limit:  $\pm ts/\sqrt{n}$  (95%)

## Conclusions

An automatic flow-though immunosensor for the analysis of SIM in environmental waters was developed that allows the fast and sensitive detection of the herbicide that improves the performance of conventional ELISAs. CPGA was a better support for the capture of the immunocomplexes formed in bulk solution than protein A/G covalently bound to an azlactone-activated polymeric material. The new FIHA allows the sensitive detection of SIM at the nanogram per liter level and showed a high reusability (more than 150 cycles), excellent precision and short analysis times. Among the *s*-triazines included in the study ATR and propazine showed appreciable cross-reactivity, whereas nonrelated herbicides did not render any response. Therefore, the assay could be applied as a screening method for triazine herbicides.

The immunosensor was applied to the analysis of SIM in contaminated river waters. Since matrix effects were not observed for any of the samples, the immunosensor allowed the direct analysis of the herbicides in these samples. The results obtained with the immunosensor were fully comparable to those obtained using SPE/HPLC-DAD and SPE/GC-NPD as an alternative techniques.

**Acknowledgements** The authors thank the Madrid Community Government (reference S-0505/AMB/0374), the ESF, the ERDF and the Ministry of Science and Education (reference CTQ2006-15610-C02). S.H. thanks the Ministry of Science and Education for a predoctoral grant.

## References

- Dagnac T, Bristeau S, Jeannot R, Mouvet C, Baran N (2005) *J Chromatogr A* 1067:225–233
- Pérez-Carrera E, León-León VM, Gómez-Parra A, González-Mazo E (2007) *J Chromatogr A* 1170:82–90
- Curren MSS, King JW (2001) *J Agric Food Chem* 49:2175–2180
- Gilman SD, Gee SJ, Hammock BD, Vogel JS, Haack K, Buchholz BA, Freeman SPHT, Wester RC, Hui X, Maibach HI (1998) *Anal Chem* 70:3463–3469
- European Union (2000) Water Framework Directive (2000/60/EC). European Union, Brussels
- Ma WT, Cai Z, Jiang GB (2003) *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:2707–2712
- Jiang H, Adams CD, Koffsky W (2005) *J Chromatogr A* 1064:219–226
- Richter P, Sepúlveda B, Oliva R, Calderón K, Seguel R (2003) *J Chromatogr A* 994:169–177
- Berzas-Nevado JJ, Guiberteau-Cabanillas C, Villaseñor-Llerena MJ, Rodríguez-Robledo V (2007) *Microchem J* 87:62–71
- Silva CL, Lima EC, Tavares MFM (2003) *J Chromatogr A* 1014:109–116
- Beltran J, López FJ, Hernández F (2000) *J Chromatogr A* 885:389–404
- Reder S, Dieterle F, Jansen H, Alcock S, Gauglitz G (2003) *Biosens Bioelectron* 19:447–455
- Kim SY, Jo Y, Choi J, Choi MJ (2001) *Microchem J* 68:163–172
- Kaur J, Singh KV, Boro R, Thampi KR, Raje M, Varshney GC, Suri CR (2007) *Environ Sci Technol* 41:5028–5036
- Graziano N, McGuire MJ, Roberson A, Adams C, Jiang H, Blute N (2006) *Environ Sci Technol* 40:1163–1171
- Dankwardt A (2000) In: Meyers RA (ed) *Encyclopedia of analytical chemistry*. Wiley, Chichester
- Thurman EM, Meyer M, Pomes M, Perry CA, Schwab AP (1990) *Anal Chem* 62:2043–2048
- Gascón J, Oubiña A, Ballesteros B, Barceló D, Camps F, Marco M-P, González-Martínez MA, Morais S, Puchades R, Maquieira A (1997) *Anal Chim Acta* 347:149–162
- González-Martínez MA, Morais S, Puchades R, Maquieira A, Marco MP, Barceló D (1998) *Fresenius J Anal Chem* 361:179–184
- González-Martínez MA, Morais S, Puchades R, Maquieira A, Ferrer I, Marco MP, Barceló D (1999) *Anal Chim Acta* 386:201–210
- Ballesteros B, Barceló D, Dankwardt A, Schneider P, Marco MP (2003) *Anal Chim Acta* 475:105–115
- Farré M, Martínez E, Ramón J, Navarro A, Radjenovic J, Mauriz E, Lechuga L, Marco MP, Barceló D (2007) *Anal Bioanal Chem* 388:207–214
- Zacco E, Galve R, Marco MP, Alegret S, Pividori MI (2007) *Biosens Bioelectron* 22:1707–1715
- Valera E, Ramón-Azcón J, Rodríguez A, Castañar LM, Sanchez FJ, Marco MP (2007) *Sens Actuators B* 125:526–537
- Ramón-Azcón J, Valera E, Rodríguez A, Barranco A, Alfaro B, Sanchez-Baeza F, Marco MP (2008) *Biosens Bioelectron* (in press)
- Feng J, Shan G, Maquieira A, Koivunen ME, Guo B, Hammock BD, Kennedy IM (2003) *Anal Chem* 75:5282–5286
- Shim WB, Yang ZY, Kim JY, Choi JG, Je JH, Kang SJ, Kolosova AY, Eremin SA, Chung DH (2006) *J Agric Food Chem* 54:9728–9734
- Chuang JC, Van Emon JM, Jones R, Durnford J, Lordo RA (2007) *Anal Chim Acta* 583:32–39
- Nishi K, Ishiuchi M, Morimune K, Ohkawa H (2005) *J Agric Food Chem* 53:5096–5104
- Bhand S, Surugiu I, Dzgoev A, Ramanathan K, Sundaram PV, Danielsson B (2005) *Talanta* 65:331–336
- Barzen C, Brecht A, Gauglitz G (2002) *Biosens Bioelectron* 17:289–295
- Goh KS, Spurlock F, Lucas AD, Kollmann W, Schoenig S, Braun AL, Stoddard P, Biggar JW, Karu AE, Hammock BD (1992) *Bull Environ Contam Toxicol* 49:348–353
- Lucas AD, Schneider P, Harrison RO, Seiber JN, Hammock BD, Biggar JW, Rolston D (1991) *J Food Agric Immunol* 3:155–167
- Ballesteros B, Barceló D, Sánchez-Baeza F, Camps F, Marco M-P (1998) *Anal Chem* 70:4004–4014
- Ballesteros B, Barceló D, Camps F, Marco MP (1997) *Anal Chim Acta* 347:139–147
- Bruun L, Koch C, Jakobsen MH, Pedersen B, Christiansen M, Aamand J (2001) *Anal Chim Acta* 436:87–101
- Li Y, Cockburn W, Kilpatrick JB, Whitelam GC (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 268:398–404
- González-Martínez MA, Morais S, Puchades R, Maquieira A, Abad A, Montoya A (1997) *Anal Chim Acta* 347:199–205
- Fintschenko Y, Wilson GS (1998) *Mikrochim Acta* 129:7–18
- Urraca JL, Benito-Peña E, Pérez-Conde C, Moreno-Bondi MC, Pestka JJ (2005) *J Agric Food Chem* 53:3338–3344
- Marco MP, Gee S, Hammock BD (1995) *Trends Anal Chem* 14:341–350
- Goodrow MH, Harrison RO, Hammock BD (1990) *J Agric Food Chem* 38:990–996
- Holthues H, Pfeifer-Fukumura U, Sound I, Baumann W (2005) *J Immunol Methods* 304:68–77
- Perez-Amodio S, Holownia P, Davey CL, Price CP (2001) *Anal Chem* 73:3417–3425
- Vanoss CJ (1995) *Mol Immunol* 32:199–211

46. Wortberg M, Goodrow MH, Gee SJ, Hammock BD (1996) *J Agric Food Chem* 44:2210–2219
47. Fischer-Durand N, Vessieres A, Heldt JM, le Bideau F, Jaouen G (2003) *J Organomet Chem* 668:59–66
48. Schobel U, Coille I, Brecht A, Steinwand M, Gauglitz G (2001) *Anal Chem* 73:5172–5179
49. Tudorache M, Emnéus J (2006) *Biosens Bioelectron* 21:1513–1520
50. Tudorache M, Co M, Lifgren H, Emnéus J (2005) *Anal Chem* 77:7156–7162
51. Goodrow MH, Hammock BD (1998) *Anal Chim Acta* 376:83–91
52. Hennion MC, Barceló D (1998) *Anal Chim Acta* 362:3–34

## AN SPR BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF MICROCYSTINS IN DRINKING WATER

S. Herranz, M. Bocková, M.D. Marazuela, J. Homola, M.C. Moreno-Bondi

*Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 2625–2634



## An SPR biosensor for the detection of microcystins in drinking water

Sonia Herranz · Markéta Bocková ·  
 María Dolores Marazuela · Jiří Homola ·  
 María Cruz Moreno-Bondí

Received: 13 April 2010 / Revised: 14 May 2010 / Accepted: 17 May 2010 / Published online: 9 June 2010  
 © Springer-Verlag 2010

**Abstract** A surface plasmon resonance (SPR) biosensor for the detection of microcystins (MCs) in drinking water has been developed. Several assay formats have been evaluated. The selected format is based on a competitive inhibition assay, in which microcystin-LR (MCLR) has been covalently immobilized onto the surface of an SPR chip functionalized with a self-assembled monolayer. The influence of several factors affecting sensor performance, such as the nature and concentration of the antibody, the composition of the carrier buffer, and the blocking and regeneration solutions, has been evaluated. The optimized SPR biosensor provides an  $IC_{50}$   $0.67 \pm 0.09 \mu\text{g L}^{-1}$ , a detection limit of  $73 \pm 8 \text{ ng L}^{-1}$ , and a dynamic range from  $0.2$  to  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  for MCLR. Cross-reactivity to other related MCs, such as microcystin-RR (88%) and microcystin-YR (94%), has also been measured. The SPR biosensor can perform four simultaneous determinations in 60 min, and each SPR chip can be reused for at least 40 assay–regeneration cycles without significant binding capacity loss. The biosensor has been successfully applied to the direct analysis of MCLR in drinking water samples,

below the provisional guideline value of  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  established by the World Health Organization for drinking water.

**Keywords** Microcystin-LR · Label-free biosensor · Self-assembled monolayer · Surface plasmon resonance

### Introduction

The concern about the effects of cyanobacteria (blue-green algae) on human health has grown in recent years, due to the increasing eutrophication of surface waters, resulting in proliferation of cyanobacterial water blooms [1, 2]. Outbreaks of human poisoning attributed to toxic cyanobacteria have been reported worldwide, following consumption of contaminated drinking water or after recreational exposure [3]. The worst incident associated with the cyanotoxins to date occurred in 1996 in Caruaru (Brazil), where a fatal intoxication at a hemodialysis clinic led to the death of over 50 renal patients [4]. The use of water from a reservoir suffering a cyanobacterial bloom, along with an insufficient water treatment to eliminate the MCs, was identified as the main cause. In addition to water, the population can be exposed to dangerous cyanotoxins through the consumption of freshwater fish or seafood and micro-algae dietary supplements [5, 6].

Among the cyanotoxins, perhaps the most studied are the so-called microcystins (MCs) that are cyclic heptapeptides, produced by several bloom-forming cyanobacteria genera (e.g., *Microcystis*, *Planktothrix*, and *Anabaena*). Among over 80 known toxic variants of MCs, microcystin-LR (MCLR), where L and R represent the variable amino acids leucine and arginine, respectively, is the most frequently present and toxic MC. Although the primary target is the liver (e.g., it promotes the formation of hepatic

Published in the special issue on *Focus on Bioanalysis* with guest editors Antje J. Baeumner, Günter Gauglitz, and Frieder W. Scheller.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00216-010-3856-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Herranz · M. D. Marazuela · M. C. Moreno-Bondí (✉)  
 Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry,  
 Universidad Complutense de Madrid,  
 28040 Madrid, Spain  
 e-mail: mcmbondi@quim.ucm.es

M. Bocková · J. Homola  
 Institute of Photonics and Electronics,  
 Academy of Sciences of Czech Republic,  
 18251 Prague, Czech Republic



tumors by chronic ingestion through food or drinking water), MCLR can also affect the kidney and the gastrointestinal tract. Less acute MCs toxicosis symptoms generally include headache, blurred vision, abdominal pain, nausea, and vomiting. Their toxicity is related to the inhibition of the protein phosphatases, thus disrupting the cellular processes.

MCs are most widely found in freshwater (e.g., rivers, lakes, and reservoirs) where they are released in substantial amounts after bacterial cell lysis or bacterial death. Moreover, their high chemical stability and water solubility lead to a long MCs persistence in the surface water bodies. Therefore, the removal of cyanotoxins and toxic cells during the water treatment processes has become a high priority for researchers and drinking water supply companies [7, 8].

Due to the significant impact of MCs on human health, the World Health Organization (WHO) has adopted a provisional guideline value of  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  for MCLR in drinking water (as it is the most toxic and frequent MC), and many countries have followed this guideline for drinking water and food as well [9]. However, recent toxicity studies suggest that even a low concentration of MCLR in water could significantly interrupt cellular processes, and thus more care should be taken in determining the criterion for MCLR content in drinking water [10].

The most widespread analytical methods for the determination of MCs in raw or drinking water are based on reversed-phase liquid chromatography (LC) combined either with ultraviolet (UV) [11, 12] or mass spectrometry detection [13–16]. These methods often require lengthy and time-consuming sample preparation procedures that usually involve the pre-concentration of considerable water volumes prior to LC analysis to reach the required sensitivity. Furthermore, the ability of these techniques to identify unknown MCs in environmental samples has been hindered by the lack of analytical standards for many MCs variants [17].

Biochemical screening methods, such as enzyme-linked immunosorbent assays [18–20], competitive enzyme immunoassays [21, 22], or protein phosphatase inhibition assays (PPIA) [20, 23], have also been described. Immunoassays and PPIA are sensitive methods with low equipment requirements that report the total MCs content, but they do not distinguish between MCs and other unrelated protein phosphatase inhibitors [24]. Recently, a commercial lateral flow dipstick (MCs ImmunoStrip®) [25] and dipsticks based on colloidal gold particles [26] have become available, and they can be used equally in the field and in the laboratory with minimum sample processing or technical expertise.

Alternatively, immunosensors based on different transduction schemes, such as optical [27–29], electrochemical

[30], and nuclear magnetic resonance [31] measurements, have been also applied to MCs determination.

Surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy has become a widely used analytical technique due to its advantages, such as the possibility to perform direct, real-time, and label-free detection of molecules in complex matrices, without the need of previous cleanup.

In this work, we describe the development of an SPR-based immunosensor for the determination of MCLR. Due to the small size of MCLR, several assay formats have been tested by immobilization of either an anti-MCLR antibody, an MCLR conjugate, or the MCLR itself. The resulting SPR immunosensor is based on a competitive inhibition assay, where MCLR is covalently attached to the SPR chip. Several parameters affecting the immunosensor performance have been optimized (antibody nature and concentration and carrier buffer composition). The immunosensor has been successfully applied to the determination of MCLR in tap water samples below the WHO recommended levels for drinking water.

## Experimental

### Reagents and materials

Microcystin-LR (MCLR), biotin-MCLR conjugate, ovalbumin-MCLR (OVA-MCLR) conjugate, and monoclonal anti-MCLR antibodies were obtained from AbKem Iberia S.L. (Vigo, Spain). Microcystin-RR (MCRR), microcystin-YR (MCYR), and monoclonal MC10E7 antibodies that rose against MCs were provided by Alexis (Läufelfingen, Switzerland). C64C12 and C64A1 monoclonal antibodies against MCLR were purchased from HyTest Ltd. (Turku, Finland). Alkanethiol  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$ , amine-alkane-thiol  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_2$ , oligo ethylene glycol alkane-thiol  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_4\text{OH}$  (EG4OH), carboxylic acid-terminated oligo ethylene glycol alkanethiol  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{COOH}$  (EG6COOH), and alkanethiol  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{-biotin}$  (BAT) were purchased by ProChimia (Gdansk, Poland).

Ethanolamine hydrochloride (EA), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) were all included in the amine coupling kit from Biacore (Uppsala, Sweden). Casein and gelatin-blocking buffers, bovine serum albumin (BSA), glutaraldehyde solution, triethylamine, and dextran sulfate sodium salt were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). SuperBlock® T20 blocking solution was provided by Thermo-Scientific (Rockford, IL, USA).

MCs stock solutions were prepared in dimethyl sulfoxide ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . MCs standard solutions for calibration purposes were prepared daily upon dilution

of the stock solutions in phosphate-buffered saline (PBS; 10 mM, pH 7.4). Water was purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). All solutions were filtered through 0.22- $\mu\text{m}$  nylon membranes (Whatman, Maidstone, UK). All other chemicals used were of analytical reagent grade.

#### SPR sensor

A four-channel SPR sensor platform developed at the Institute of Photonics and Electronics (Prague) [32, 33] was used. The SPR sensor is based on the Kretschmann geometry of the attenuated total reflection method and spectral modulation. In this configuration, broadband light from a halogen lamp is collimated and reflected from the base of the prism to which an SPR chip is attached. The chip consists of a thin gold layer (50-nm thickness), deposited on a glass substrate. Upon the incidence of light on the chip, the excitation of the surface plasmons occurs. The light reflected from four areas (sensing channels) on the gold layer is collected via GRIN lenses into four optical fibers, which are connected to a four-channel spectrograph. A flow-cell with four separate flow chambers is interfaced with the chip to confine the sample during experiments. Each flow chamber is aligned to cover one sensing channel. A multichannel peristaltic pump is used to deliver liquid samples over each sensing channel. The acquired spectra are analyzed in real-time by a special software package that allows determination of the resonant wavelength in each sensing channel. In the reported experiments, the flow rate of 30  $\mu\text{L min}^{-1}$  was used, unless otherwise stated. Temperature was kept at 25  $^{\circ}\text{C}$ .

#### Assay formats

Several competitive inhibition assay formats, based on the immobilization of the anti-MC antibody, MCLR, or MCLR conjugates, have been evaluated for immunosensor development (Fig. 1).

Prior to functionalization, the gold SPR chip was cleaned by washing with absolute ethanol, drying with nitrogen stream, and by cleaning in UV ozone cleaner for 10 min to remove organic contaminants. The chip surface was washed with deionized water followed with absolute ethanol and dried with a stream of pure nitrogen.

#### *Immunoassays based on the immobilization of anti-MC antibodies*

The gold layer on the SPR chip (the sensor surface) was coated with the anti-MC antibody following two different approaches: (a) covalent immobilization on a self-assembled monolayer (SAM) via the terminal carboxylic groups and (b)

immobilization as a covalently cross-linked double layer. Due to the small size of MCLR, the detection was carried out by competition between the MCLR and an OVA-MCLR conjugate (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in PBS), flowed along the sensor surface for 30 min. The amount of the OVA-MCLR conjugate bound to the immobilized antibody was measured both in the presence and in the absence of MCLR.

#### *Covalent immobilization via carboxylic-SAM (surface I)*

The anti-MCs antibody was covalently attached by amino coupling to the sensor chip functionalized with a terminal carboxylic-SAM. The chips were incubated with a 200- $\mu\text{M}$  solution of thiols EG4OH and EG6COOH (7:3, v/v) in degassed absolute ethanol [34] for 30 min at 40  $^{\circ}\text{C}$  and left overnight at room temperature in a dark place. Afterwards, they were cleaned with ethanol, dried with  $\text{N}_2$ , and mounted in the SPR device. The carboxylic groups on the sensor surface were activated with 200 mM EDC and 50 mM NHS (20  $\mu\text{L min}^{-1}$ , 5 min) followed by incubation (30  $\mu\text{L min}^{-1}$ , 30 min) with the antibody solution (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in 10 mM sodium acetate, pH 5.0). Non-covalently bound antibody was removed by washing with high ionic strength phosphate buffer (HIS-PB; 10 mM, pH 7.4, 0.75 M NaCl, 5 min), followed by EA (1 M, pH 8.5, 5 min) to deactivate residual carboxylic groups.

*Covalently cross-linked double layer (surface II)* The antibodies were immobilized onto the chip surface following the procedure described by Koubová et al. [35]. Briefly, the sensors were sequentially treated with an anti-MC antibody solution (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in 60 mM citrate buffer, pH 4.0, 15 min), a solution of dextran sulfate polyanions (1 mg  $\text{mL}^{-1}$  in citrate buffer, 20 min), and again with the anti-MC antibody solution. The resulting multilayer was cross-linked with a solution of 0.5% glutaraldehyde in citrate buffer. Finally, dextran sulfate was removed from the cross-linked antibody assembly by replacing citrate buffer by PBS.

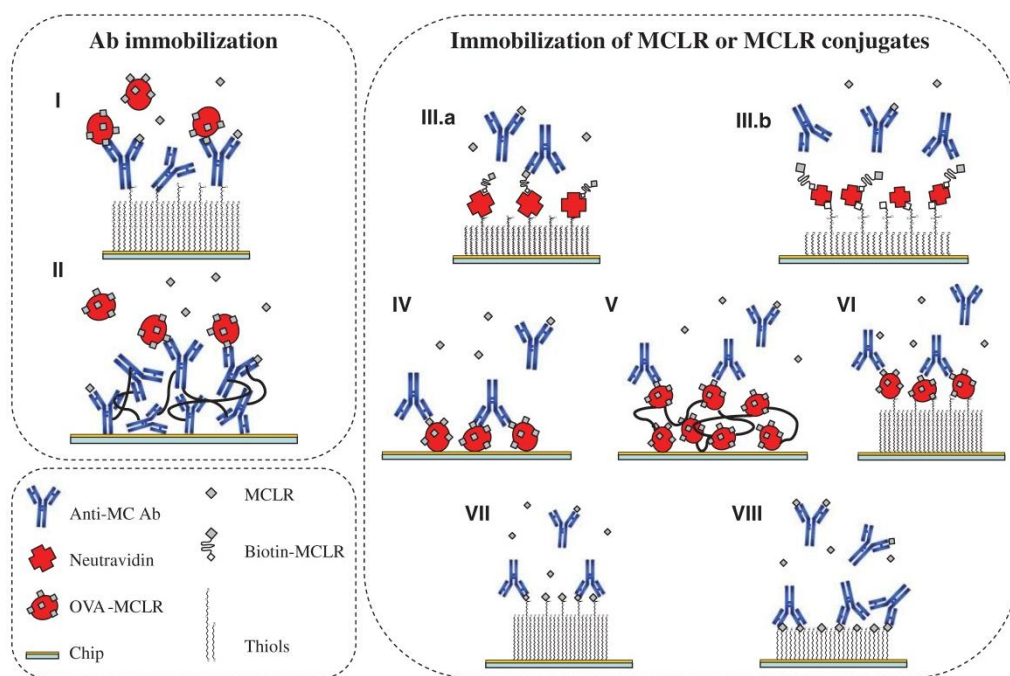
#### *Immunoassays based on the immobilization of MCLR or MCLR conjugates*

The following assay formats have been tested based on the immobilization of (a) a biotin-MCLR conjugate, (b) an OVA-MCLR conjugate, or (c) MCLR. Detection was carried out by real-time monitoring of the interaction between the anti-MCLR antibodies and the immobilized MCLR or MCLR conjugates, respectively.

#### *Immobilization of a biotin-MCLR conjugate (surface III)*

The biotin-MCLR conjugate was immobilized on neutravidin-coated chips via a non-covalent, high-affinity,





**Fig. 1** Assay formats. (I) Covalent immobilization of the antibody via carboxylic-SAM; (II) covalently cross-linked antibody double layer; (III) immobilization of a biotin-MCLR conjugate on a neutravidin layer (III.a, covalent immobilization of the neutravidin; III.b, neutravidin immobilization via biotin-avidin bond); (IV) physical

adsorption of an OVA-MCLR conjugate; (V) covalently cross-linked OVA-MCLR double layer; (VI) covalent immobilization of an OVA-MCLR conjugate; (VII) covalent immobilization of MCLR via amino groups, and (VIII) covalent immobilization of MCLR via carboxylic groups

and stable neutravidin–biotin bond. Two different approaches were investigated for neutravidin coupling:

- Covalent attachment of neutravidin to a carboxylic-SAM (surface III.a): Neutravidin was covalently attached to the chip surface functionalized with a terminal carboxylic-SAM, following the procedure described in “Covalent immobilization via carboxylic-SAM (surface I).” The activated carboxylic groups were reacted with a solution of neutravidin ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  in sodium acetate) for 5 min and then with the biotin-MCLR conjugate ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  in PBS) for 30 min.
- Non-covalent binding of neutravidin on a biotin-SAM (surface III.b): The chip was functionalized with a mixture of alkanethiol  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$  and biotinylated alkanethiol (BAT; 9:1, total concentration of  $100 \mu\text{M}$ ) in ethanol, following the procedure described in “Covalent immobilization via carboxylic-SAM (surface I),” mounted in the SPR instrument and treated with a solution of neutravidin ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  in sodium acetate) for 10 min.

#### Immobilization of an OVA-MCLR conjugate

- Physical adsorption (surface IV): The chips were mounted in the SPR instrument, and a solution of OVA-MCLR ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  in sodium acetate) was allowed to flow over the gold surface for 5–10 min.
- Covalently cross-linked double layer (surface V): The OVA-MCLR conjugate ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was immobilized on the chip according to the protocol described in “Covalently cross-linked double layer (surface II).”
- Covalent immobilization (surface VI): The OVA-MCLR conjugate ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was covalently immobilized by amino coupling onto the chip surface functionalized with a carboxylic-SAM, following the procedure described in “Covalent immobilization via carboxylic-SAM (surface I).”

#### Immobilization of MCLR

- Covalent binding via amino groups (surface VII): MCLR ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was covalently immobilized by

amino coupling onto the sensor surface functionalized with a carboxylic-SAM (see “Covalent immobilization via carboxylic-SAM (surface I)”).

- (b) Covalent binding via carboxylic groups (surface VIII): The chips were immersed in an amine-alkanethiol HS  $(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_2$  ethanolic solution (0.2 mM), containing 2% of triethylamine and kept in the dark at room temperature for at least 1 day in order to obtain the amine-SAM. Afterwards, the chips were sequentially rinsed with ethanol, a solution of 10% acetic acid in ethanol (v/v), ethanol, and were dried with  $\text{N}_2$ . A mixture of EDC/NHS and MCLR in PBS (final concentration in solution, 80 mM EDC, 20 mM NHS, and 10  $\mu\text{M}$  MCLR) was then pumped for 30 min, and finally, the non-covalently bound MCLR was removed with HIS-PB.

#### Assay protocol

The measuring principle was based on a competitive inhibition assay between MCLR, immobilized onto the surface of the SPR chip, functionalized with an amine-alkanethiol-SAM as described previously (“Immobilization of MCLR,” surface VIII), and MCLR present in the sample for a limited number of antibody binding sites.

All solutions were prepared in PBS (carrier solution). The MCLR standard solutions (950  $\mu\text{L}$ ) were mixed with 50  $\mu\text{L}$  of the antibody solution (4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). After pre-incubation at room temperature for 10 min, the mixture was pumped over the sensor surface for 30 min. During this step, the free antibody interacts with the immobilized MCLR, resulting in a signal increase that depends on the concentration of MCLR in the sample. Figure 2 shows a typical sensorgram for real-time detection of MCLR. Finally, the sensor surface was regenerated by flowing of a 50-mM NaOH solution (15 min). A complete cycle, including chip regeneration, can be accomplished in 60 min.

The SPR sensor response was normalized according to the following expression (Eq. 1):

$$\text{Normalized response} = (B - B_{\infty}) / (B_0 - B_{\infty}) \quad (1)$$

where  $B$  is the signal measured in the presence of increasing MCLR concentrations,  $B_{\infty}$  is the background obtained in the presence of an excess of MCLR, and  $B_0$  is the signal in absence of MCLR. The normalized response was plotted against the concentration of MCLR (in logarithmic scale), and the experimental data were fitted to a four-parameter logistic equation (sigmoidal; Eq. 2):

$$\text{Normalized signal} = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + \left( \frac{[\text{Analyte}]}{\text{IC}_{50}} \right)^b} + A_{\min} \quad (2)$$

where  $A_{\max}$  is the asymptotic maximum (maximum signal in the absence of MCLR),  $b$  represents the curve slope at the inflection point,  $\text{IC}_{50}$  is the concentration of analyte at the inflection point (concentration giving 50% inhibition of  $A_{\max}$ ), and  $A_{\min}$  is the asymptotic minimum. The detection limit (LOD) was calculated as the MCLR concentration for which the antibody binding to the immobilized MCLR was inhibited by 10%, and the dynamic range (DR) of the method was evaluated as the MCLR concentrations that produced a normalized signal between 20% and 80% of  $B_0$ .

#### Selectivity studies

Cross-reactivity (CR) studies were carried out by measuring the competitive inhibition curves for other MCs variants under the optimized conditions. CR was calculated according to the following equation (Eq. 3):

$$\% \text{CR} = \frac{\text{IC}_{50}(\text{MCLR})}{\text{IC}_{50}(\text{cross-reacting compound})} \times 100 \quad (3)$$

#### Analysis of water samples

Tap water samples were collected in plastic bottles previously rinsed with ultrapure water. The pH and ionic strength of the water samples was adjusted by addition of PBS, and they were stored at 4 °C until analysis. The samples were filtered through a 0.22- $\mu\text{m}$  nylon membrane and finally spiked with MCLR. The analyses were performed in triplicate.

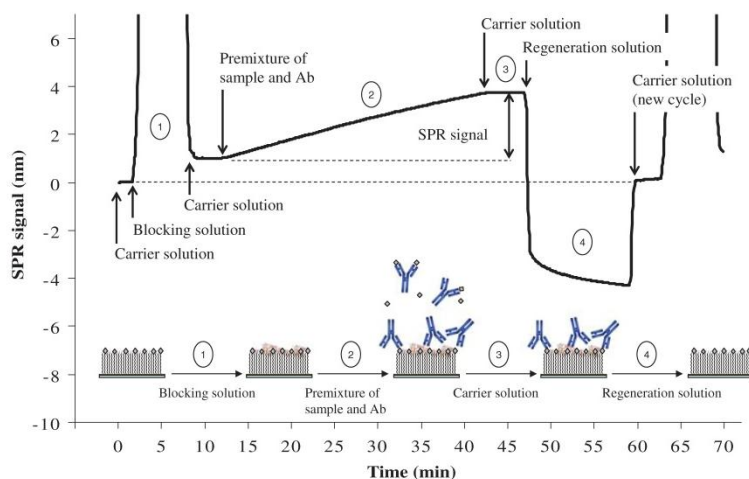
## Results and discussion

#### Comparison of the different assay formats

In order to select the most appropriate format and to achieve a defined and sufficiently high density of immobilized receptors without loss of their biological activity, two assays based on anti-MCLR antibody immobilization and seven based on MCLR or MCLR conjugate (OVA-MCLR or biotin-MCLR) immobilization were evaluated. The results are shown in Fig. 3.

When MCLR was immobilized onto the chip functionalized with a carboxylic-SAM by covalent binding through the amino groups (surface VII), a high SPR signal was obtained, but it was mainly due to the non-specific binding of the antibody to the sensor surface. As follows from Fig. 3, this high non-specific adsorption of the antibody causes a minimal reduction of the signal in the presence of a high amount of MCLR in the sample. Therefore, this assay format was not sensitive enough to MCs. To improve

**Fig. 2** Selected biosensor assay format and typical sensorgram for the detection of MCLR



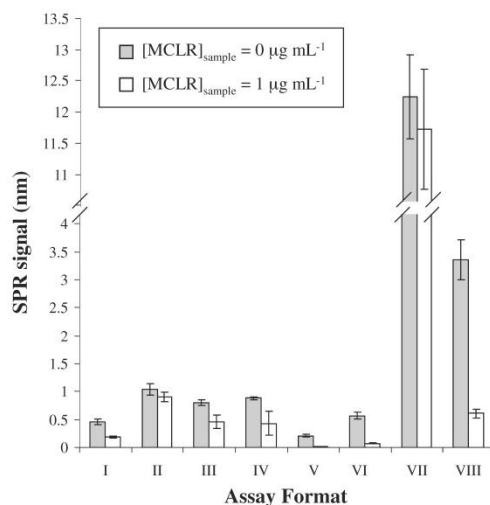
the sensitivity of the assay, several parameters were optimized, such as the nature of the carrier buffer and blocking solutions before the detection step. However, no improvement in sensitivity was observed.

A poor SPR signal and a high degree of non-specific binding was also observed when a biotin-MCLR conjugate was immobilized onto a neutravidin carboxylic-SAM-modified chip surface (surface III.a). In this case, in the reference channels, the biotin-MCLR conjugate was replaced by biotin during the chip functionalization step. To improve the sensitivity, the covalent immobilization of neutravidin was replaced by a non-covalent immobilization via biotin-neutravidin interaction (surface III.b). Moreover, the use of streptavidin instead of neutravidin, or of different carrier buffers and/or blocking reagents, did not increase the assay sensitivity.

The best results in terms of sensitivity (Fig. 3) were obtained for the assay formats V (covalently cross-linked double layer of OVA-MCLR conjugate), VI (covalent immobilization of the OVA-MCLR conjugate), and VIII (immobilization of MCLR onto an amine-SAM-functionalized chip). However, the assay format VIII resulted in a higher SPR response, showing the maximal signal in the absence of MCLR ( $B_0$ ). The effect of the concentration of the OVA-MCLR conjugate in both V and VI approaches was evaluated. Thus, the chips were functionalized with concentrations of 25, 50, and  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  of OVA-MCLR, but similar results in terms of response intensity were observed. The low SPR response when using OVA-MCLR may originate from the low ratio of MCLR per protein molecule. Considering the results obtained, we selected the assay format VIII, based on the immobilization of MCLR onto an amine-SAM-functionalized SPR chip, as the most appropriate for further biosensor development and optimization.

#### Biosensor optimization and characterization

Several parameters affecting the performance of the SPR biosensor have been evaluated: the concentration of MCLR in the immobilization solution, the nature of the carrier



**Fig. 3** Comparison of the different assay formats. (I) Covalent immobilization of the antibody via carboxylic-SAM; (II) covalently cross-linked antibody double layer; (III) immobilization of a biotin-MCLR conjugate on a neutravidin layer; (IV) physical adsorption of an OVA-MCLR conjugate; (V) covalently cross-linked OVA-MCLR double layer; (VI) covalent immobilization of an OVA-MCLR conjugate; (VII) covalent immobilization of MCLR via amino groups, and (VIII) covalent immobilization of MCLR via carboxylic groups ( $n=3$ )



buffer and regeneration solutions, concentration of the antibody, etc.

#### Optimization of the MCLR immobilization step

Two different experimental approaches have been applied for the covalent immobilization of MCLR onto the surface of the SPR chip, functionalized with an amine-thiols SAM: (1) immobilization in situ, within the SPR instrument, by flowing a solution of MCLR and EDC/NHS across the chip surface (see “Immobilization of MCLR,” b) and (2) a static immobilization by covering the chip-sensing area with the MCLR and EDC/NHS mixture and left incubate overnight at 4 °C.

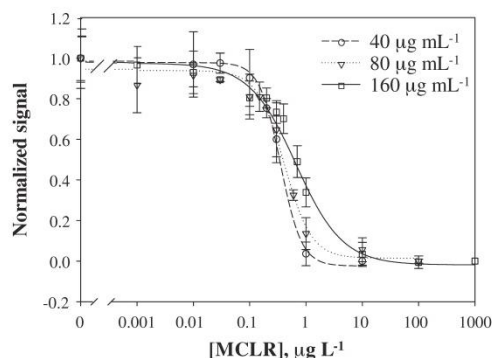
Afterwards, calibration was performed using standard MCLR solutions, in the range from 0 to 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 0.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of antibody. Although similar results, in terms of detection limit,  $\text{IC}_{50}$  and dynamic range were obtained, an important difference in chip stability was observed depending on MCLR immobilization approach. The chip resulting from the static immobilization was stable (retaining 98% of the initial response) after at least 15 detection-regeneration cycles. By contrast, the chip obtained by in situ immobilization showed a decrease of 40% in the response after ten assay-regeneration cycles. These results suggest that the static immobilization yield a higher amount of immobilized MCLR than the in situ immobilization. On the other hand, it is also possible that the MCLR immobilized by the in situ procedure was partly adsorbed and not covalently bound to the surface. Therefore, the adsorbed MCLR could be easily washed out after several regenerations steps, which would explain the stabilization of the SPR signal in a 60% of the initial response after ten assay-regeneration cycles. Unfortunately, the small size of the MCLR does not allow real-time monitoring of the amount of immobilized analyte. Therefore, the static immobilization was selected for further studies.

No signal was detected when a solution of MCLR in the absence of EDC/NHS was injected in the reference channels.

The concentration of the MCLR solutions used for chip functionalization was also evaluated. An increase of the MCLR concentration led to a lower LOD and a wider dynamic range (see Fig. 4). Therefore, an MCLR concentration of 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was chosen for chip functionalization. Concentrations higher than 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were not tested to balance the obtained improvement of the analytical characteristics of the biosensor and consumption of costly and toxic MCLR.

#### Immunoassay optimization

**Influence of the carrier solution** We have tested several buffer composition, such as HEPES, Tris, PB, PBS,

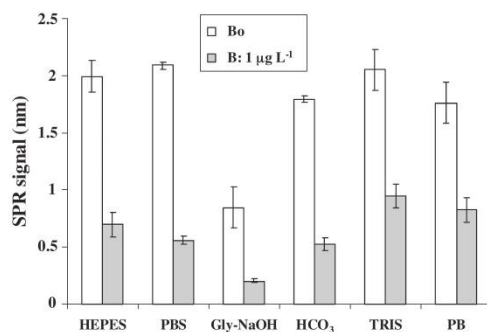


**Fig. 4** Competitive inhibition curves as a function of the concentration of the MCLR solution used for chip functionalization ( $n=3$ )

glycine-NaOH (Gly-NaOH), and bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ), at a concentration of 10 mM and pH 7.4.

The SPR signal intensity was measured, both in the absence ( $B_0$ ) and in the presence ( $B$ ) of a 1- $\mu\text{g L}^{-1}$  MCLR in solution. The results depicted in Fig. 5 show that PBS provided the highest sensitivity (in terms of lowest  $B/B_0$  ratio) and the highest  $B_0$  of all studied buffers. This finding can be attributed to the presence of small cations, such as  $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$ , which favor a closer interaction between the epitope and the paratope and increase the stability of the immunocomplex [36]. The effect of pH within the range from 5.0 to 9.0 was also studied, but no significant differences were observed. Therefore, PBS at pH 7.4 was selected as the carrier solution for further experiments.

**Influence of the nature and concentration of the antibody** Four different anti-MCLR monoclonal antibodies (from Abkem Iberia, Alexis, and HyTest Ltd.) were tested. C64C12 and C64A1 monoclonal antibodies from Hytest showed the



**Fig. 5** Influence of the carrier solution on the  $B/B_0$  ratio ( $n=3$ )

lowest  $B_0$  signal ( $<0.2$  nm), whereas the highest  $B_0$  signal was measured when Abkem antibodies were used ( $>5$  nm). Nevertheless, the latter was mainly due to the non-specific binding of the antibody to the chip surface, which was also observed in the control channels (chip surface functionalized with the amine-SAM, but in the absence of immobilized MCLR). The best results, in terms of sensitivity (lowest  $B/B_0$  ratio), were obtained when using MC10E7 monoclonal antibodies from Alexis that provided a sufficient  $B_0$  signal (between 2.5 and 3 nm) with a low non-specific binding to the chip surface ( $\sim 20\%$  of the measured signal) and were selected for further experiments.

In order to reduce the non-specific binding and avoid false negative results, several blocking solutions have been assayed including, SuperBlock® T20, casein, gelatin, and BSA solutions, all prepared in PBS at a flow rate of  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ . A 5-min treatment with the SuperBlock® T20 solution provided a slightly higher SPR sensor response compared to the other blocking agents.

The effect of the antibody concentration ( $0.1$  to  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was evaluated in the presence of different MCLR solutions ( $0$  to  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; Fig. S1 electronic supplementary material). A decrease of the antibody concentration from  $0.5$  to  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  yields to lower  $\text{IC}_{50}$ , detection limits, and wider dynamic ranges; however, concentrations below  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  led to the weakest response and lower precision. Thus, a concentration of  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  was selected for further experiments.

**Regeneration solution** Four different media were tested for sensor regeneration, namely, NaCl  $1$  M, glycine-HCl buffer ( $0.1$  M, pH  $2.0$ ), HCl, and NaOH solutions.

The efficiency of the regeneration step was determined by measuring the amount of antibody that remains bound to the chip surface after a 5-min regeneration step. The use of NaCl yielded the highest percentage of residual antibody bound to the surface: over  $85\%$  against  $34\%$  and  $26\%$  for  $30$  mM HCl and  $30$  mM NaOH, respectively. The glycine-HCl buffer did not improve these results. Increasing the NaOH concentration from  $30$  to  $60$  mM led to a more effective antibody removal. Finally, efficient regeneration ( $99 \pm 5\%$ ) of the sensor surface was achieved using  $50$  mM NaOH ( $30 \mu\text{L min}^{-1}$ ,  $15$  min).

The optimized assay conditions are summarized in Table 1.

#### Analytical characteristics

The SPR instrument used in this work incorporates a four-channel chamber, thus allowing the measurement of four samples simultaneously. The reproducibility of biosensor was evaluated both, among channels and cycles. The

**Table 1** Summary of the optimized immunoassay conditions

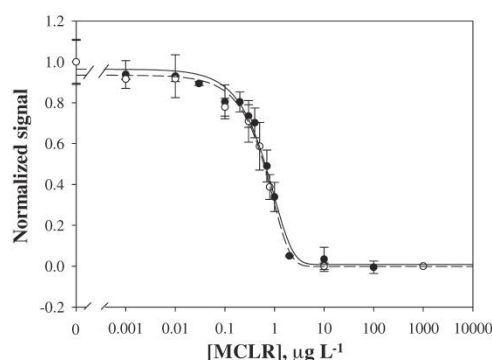
Parameter	Studied range	Optimized conditions
[MCLR] for immobilization, $\mu\text{g L}^{-1}$	40–160	160
Anti-MCs antibody brand	Alexis AbKem Iberia Hytest	Alexis
Concentration of anti-MCs antibody, $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.1–0.5	0.2
Pre-incubation time, min	10–60	10
Carrier solution	PB PBS HEPES Tris Glycine Bicarbonate	PBS
Carrier solution pH	5.0–9.0	7.4
Blocking solution	Superblock T20 Casein BSA Gelatin	Superblock T20
Regeneration solution	NaCl HCl glycine-HCl NaOH	NaOH ( $50$ mM)
Chip stability	—	$\geq 40$ cycles

reproducibility of the biochips was investigated under the optimized conditions by monitoring the SPR signal in the absence of MCLR ( $B_0$ ; nine to ten cycles per day) over 6 days. The biochips were stored at  $4^\circ\text{C}$  protected from light when not used.

The change in biosensor response was negligible after 40 assay–regeneration cycles (in total, 160 measurements), maintaining about  $95\%$  (RSD,  $<13\%$ ) of the original  $B_0$  value. The reproducibility among channels was excellent with RSDs values below  $7\%$ . The reproducibility among biochips ( $n=4$ ) was found to be in the range from  $5\%$  to  $15\%$  (depending on the MCLR concentration).

Figure 6 shows a typical competition inhibition curve measured under the optimized conditions using MCLR standard solutions in the range from  $0$  to  $1,000 \mu\text{g L}^{-1}$ . The  $\text{IC}_{50}$  value and the LOD were  $0.67 \pm 0.09 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $73 \pm 8 \text{ ng L}^{-1}$ , respectively. The dynamic range (normalized signal in the range from  $20\%$  to  $80\%$ ) was from  $0.2$  to  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

The sensitivity of the developed SPR biosensor was superior to that previously reported for other SPR-based devices [29], and the LOD is comparable, or even lower, than those reported for other immunosensors [26–28, 31, 37]. Moreover, it presents other advantages, such as the



**Fig. 6** Competitive calibration curves obtained with the SPR immunosensor for (closed circles) MCLR standard solutions in PBS (10 mM, pH 7.4) and (open circles) MCLR standard solutions prepared in tap water ( $n=3$ )

possibility of real-time and label-free monitoring up to four samples simultaneously.

#### Cross-reactivity

Among the 80 MC variants identified up to date, MCLR, MCRR, and MCYR are the most common [1]. Therefore, the cross-reactivity for MCRR and MCYR was also tested, and the results are summarized in Table 2.

The selected MC10E7 monoclonal antibodies show group specificity for [4-arginine]-MCs, as it has been already reported [38]. Therefore, the high cross-reactivity exhibited for MCRR and MCYR can be explained considering the presence of the 4-arginine residue and the Adda group, the common moiety of MCs that seems to play an important role for antibody recognition. Since the antibody recognizes MCLR, MCRR, and MCYR with similar sensitivities, the biosensor allows the quantification of the total concentration of the three most common MCs in water samples.

#### Analysis of tap water samples

The SPR biosensor has been successfully applied to the determination of MCLR in drinking water samples. Tap

water samples were spiked with MCLR, in the concentration range from 0 to 1,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , and further analyzed under the optimized conditions. The samples were checked previously to contain undetectable levels of the toxin. A comparison of the dose–calibration curves obtained both in tap water and ultrapure Milli-Q water (Fig. 6) show that there is no matrix effect, and therefore, the developed immunosensor allows direct determination of MCLR in these samples.

Table 3 shows the results obtained with SPR biosensor. Mean recoveries of analyzed samples were  $105 \pm 17\%$ . These results demonstrate that the developed biosensor is suitable for the analysis of MCLR at levels below the provisional guideline value for drinking water proposed by WHO (1  $\mu\text{g L}^{-1}$  for MCLR) without the need of previous sample cleanup and pre-concentration.

#### Conclusions

An SPR biosensor has been developed that allows the determination of MCLR in drinking water samples in a fast and sensitive way. The biosensor working principle is based on a competitive inhibition assay, in which the analyte (MCLR) has been covalently immobilized onto the SPR chip surface functionalized with an amine-SAM. The new immunosensor allows detection of MCLR at levels below the provisional guideline value of 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  proposed by WHO. Moreover, it shows high stability, reusability (at least 40 assay–regeneration cycles with the same chip), and excellent precision. The configuration of the SPR instrument used for this work incorporates a four-channel chamber, thus allowing the measurement of four samples simultaneously with short analysis times (one complete measurement–regeneration cycle can be accomplished in 60 min). The  $\text{IC}_{50}$  and the LOD were of 0.67  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 73  $\text{ng L}^{-1}$ , respectively, clearly lower than those reported for other SPR-based devices. Besides MCLR, the biosensor has shown excellent cross-reactivity for other MCs variants, such as MCRR and MCYR, which are together with MCLR, the most abundant in the environment.

Finally, the MCs biosensor has been successfully applied to the direct analysis of tap water samples without any cleanup or pre-concentration steps.

**Table 2** Cross-reactivity study ( $n=3$ )

Analyte	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	$\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	DR, $\mu\text{g L}^{-1}$	CR (%)
MCLR	$0.073 \pm 0.008$	$0.67 \pm 0.09$	0.2–2.0	100
MCRR	$0.24 \pm 0.06$	$0.76 \pm 0.02$	0.4–1.4	$88 \pm 3$
MCYR	$0.20 \pm 0.04$	$0.72 \pm 0.04$	0.3–1.5	$94 \pm 5$

**Table 3** Analysis of tap water samples ( $n=3$ )

MCLR spiked level, $\mu\text{g L}^{-1}$	Detected concentration, $\mu\text{g L}^{-1}$	Recovery (%)
0.3	$0.37 \pm 0.07$	123
0.5	$0.44 \pm 0.12$	88
0.8	$0.83 \pm 0.03$	103

**Acknowledgements** This work has been funded by the Madrid Regional Government (ref. S-0505/AMB/0374), the ESF, the ERDF, the Spanish MEC (grant CTQ2006-15610-C02), Complutense University (GR58-08), by the Academy of Sciences of the Czech Republic (grant KAN200670701), and by the Ministry of Education, Youth and Sports (grant OC09058). Sonia Herranz thanks the Madrid Regional Government and the MEC for a doctoral and a travel grant, respectively.

## References

- Sivonen K (2009) Cyanobacterial toxins in encyclopedia of microbiology. Elsevier, Oxford, pp 290–307
- Messineo V, Bogialli S, Melchiorre S, Sechi N, Lugliè A, Casiddu P, Mariani MA, Padedda BM, Di Corcia A, Mazza R, Carloni E, Bruno M (2009) *Limnologia* 39:95–106
- Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Goncalves FJM, Pereira MJ (2004) *Ecotoxicol Environ Saf* 59:151–163
- Azevedo SMFO, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau SH, Shaw GR, Egelsham GK (2002) *Toxicology* 181:182:441–446
- Ibelings WB, Chorus I (2007) *Environ Pollut* 150:177–192
- Ortelli D, Edder P, Cognard E, Jan Ph (2008) *Anal Chim Acta* 617:230–237
- Jurczak T, Tarczynska M, Izydoreczyk K, Mankiewicz J, Zalewski M, Meriluoto J (2005) *Water Res* 39:2394–2406
- Campinas M, Rosa MJ (2010) *Sep Purif Technol* 71:114–120
- WHO (2003) Guidelines for drinking-water quality. Cyanobacterial toxins: microcystin-LR in drinking water. WHO/SDE/WSH/03.04/57
- Wang M, Chan LL, Si M, Hong H, Wang D (2010) *Toxicol Sci* 113:60–69
- ISO (2005) ISO Standard 10179:2005. Water quality. Determination of microcystins. Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection. International Organization for Standardization, Geneva
- Spoof L, Neffling MR, Meriluoto J (2010) *Toxicol* 55:954–964
- Mekebri A, Blondina GJ, Crane DB (2009) *J Chromatogr A* 1216:3147–3155
- Cong L, Huang B, Chen Q, Lu B, Zhang J, Ren Y (2006) *Anal Chim Acta* 569:157–168
- Bogialli S, Bruno M, Curini R, Di Corcia A, Fanali C, Laganà A (2006) *Environ Sci Technol* 40:2917–2923
- Neffling MR, Meriluoto J, Spoof L (2009) *Anal Chim Acta* 653:234–241
- McElhiney J, Lawton LA (2005) *Toxicol Appl Pharmacol* 203:219–230
- Pyo D, Lee J, Choi E (2005) *Microchem J* 80:165–169
- Lindner P, Molz R, Yacoub-George E, Dürkop A, Wolf H (2004) *Anal Chim Acta* 521:37–44
- Mountfort DO, Holland P, Sprosen J (2005) *Toxicol* 45:199–206
- Khreich N, Lamourette P, Renard PY, Clavé G, Fenaille F, Creminon Ch, Volland H (2009) *Toxicol* 53:551–559
- Long F, Shi HC, He M, Sheng JW, Wang JF (2009) *Anal Chim Acta* 649:123–127
- Allum LL, Mountfort DO, Gooneratne R, Pasco N, Goussain G, Hall EAH (2008) *Toxicol* 52:745–753
- Sangolkar LN, Maske SS, Chakrabarti T (2006) *Water Res* 40:3485–3496
- Lawton LA, Chambers H, Edwards Ch, Nwaopara AA, Healy M (2010) *Toxicol* 55:973–978
- Tippkötter N, Stückmann H, Kroll S, Winkelmann G, Noack U, Scheper T, Ulber R (2009) *Anal Bioanal Chem* 394:863–869
- Long F, He M, Zhu AN, Shi HC (2009) *Biosens Bioelectron* 24:2346–2351
- Lindner P, Molz R, Yacoub-George E, Wolf H (2009) *Anal Chim Acta* 636:218–223
- Hu C, Gan N, Chen Y, Bi L, Zhang X, Song L (2009) *Talanta* 80:407–410
- Loyprasert S, Thavarungkul P, Asawatreratanakul P, Wongkittisuksa B, Limsakul C, Kanatharana P (2008) *Biosens Bioelectron* 24:78–86
- Ma W, Chen W, Qiao R, Liu C, Yang C, Li Z, Xu D, Peng C, Jin Z, Xu S, Wang L (2009) *Biosens Bioelectron* 25:240–243
- Homola J, Lu HBB, Nenninger GG, Dostálek J, Yee SS (2001) *Sens Actuators B* 76:403–410
- Hegnerová K, Bocková M, Vaisocherová H, Křištofiková Z, Řičný J, Řípová D, Homola J (2009) *Sens Actuators B* 139:69–73
- Vaisocherová H, Zítová A, Lachmanová M, Štěpánek J, Králíkova Š, Liboska R, Rejman D, Rosenberg I, Homola J (2006) *Biopolymers* 82:394–398
- Koubová V, Brynda E, Karasová L, Škvor J, Homola J, Dostálek J, Tobiška P, Rošický J (2001) *Sens Actuators B* 74:100–105
- Bruun L, Koch C, Jakobsen MH, Pedersen B, Christiansen M, Aamand J (2001) *Anal Chim Acta* 436:87–101
- Yu HW, Lee J, Kim S, Nguyen GH, Kim IS (2009) *Anal Bioanal Chem* 394:2173–2181
- Zeck A, Eikenberg A, Weller MG, Niessner R (2001) *Anal Chim Acta* 441:1–13



## Analytical and Bioanalytical Chemistry

### Electronic Supplementary material

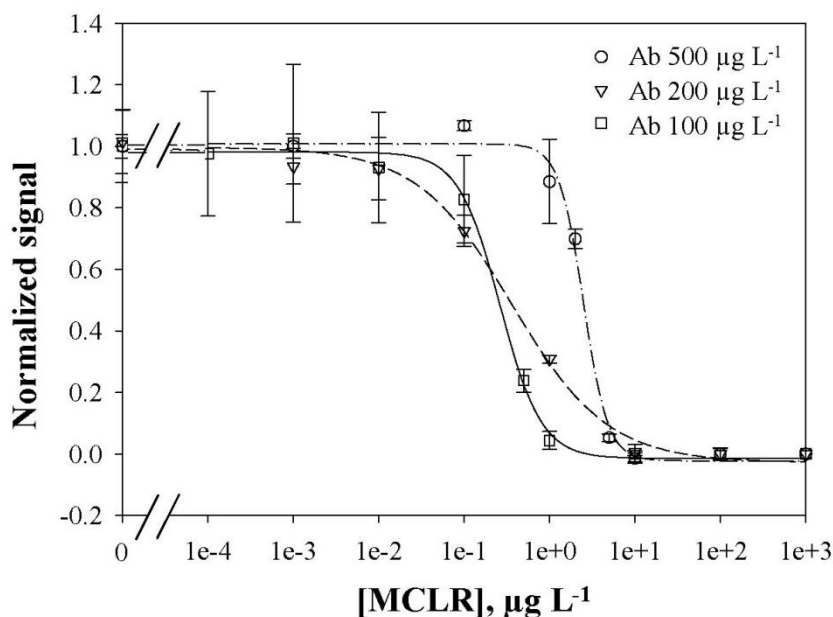
### An SPR biosensor for the detection of microcystins in drinking water

Sonia Herranz<sup>§</sup>, Markéta Bocková<sup>#</sup>, María Dolores Marazuela<sup>§</sup>, Jiří Homola<sup>#\*</sup>, María Cruz Moreno-Bondí<sup>§\*</sup>

<sup>§</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, E-28040, Madrid, Spain. <sup>#</sup>Institute of Photonics and Electronics, Academy of Sciences of Czech Republic, 182 51 Prague, Czech Republic

Email: [mcmbondi@quim.ucm.es](mailto:mcmbondi@quim.ucm.es)

**Figure S1.** Competitive inhibition curves as a function of the antibody concentration.







**AUTOMATED PORTABLE ARRAY BIOSENSOR FOR MULTISAMPLE  
MICROCYSTIN ANALYSIS IN FRESHWATER SAMPLES**

S. Herranz, M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi

**Biosensors and Bioelectronics 33 (2012) 50–55**





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bios](http://www.elsevier.com/locate/bios)

# Automated portable array biosensor for multisample microcystin analysis in freshwater samples

S. Herranz, M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondí\*

Chemical Optosensors & Applied Photochemistry Group (CSOLFA), Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 October 2011

Received in revised form 4 December 2011

Accepted 10 December 2011

Available online 20 December 2011

## Keywords:

Array

Biosensor

Microcystins

Fluoroimmunoassay

Evanescent wave

## ABSTRACT

An automated array biosensor based on evanescent-wave excitation has been developed for the detection of microcystins (MCs) in freshwater samples. The sensing surface consisted of microcystin-leucine-arginine (MCLR) covalently immobilized onto a planar waveguide (microscope slide). The binding of anti-MCLR monoclonal antibodies, spiked in the sample, to the immobilized MCLR was competitively inhibited by MCLR in solution and the amount of antibody bound to the patterned antigens was revealed using Cy5-labeled rabbit anti-mouse IgG. Surface chemistry has been optimized to improve biosensor performance in terms of sensitivity, regeneration ability and to avoid non specific binding for further application to environmental monitoring. The optimized biosensor assay presents an  $IC_{50}$  value of  $0.34 \pm 0.01 \mu\text{g/L}$ , a detection limit of  $16 \pm 3 \text{ ng/L}$  and a dynamic range from  $0.06$  to  $1.5 \mu\text{g/L}$  MCLR, improving the performance of previously reported devices. Cross-reactivity to other related MCs, such as microcystin-RR (MCRR, 90%), microcystin-RR desmethylated (dm-MCRR, 95%) and microcystin-YR (MCYR, 91%), was also evaluated. The automated microarray can assay up to six different samples in parallel, with a total analysis time of about 60 min. The sensing surface was regenerated with 50 mM NaOH and each chip was reused for, at least, 15 assay-regeneration cycles without significant binding capacity loss. The immunosensor has been successfully applied to the direct analysis of MCs in surface water samples and the results were in close agreement with those provided by LC–MS/MS.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Microcystins (MCs) are a group of dangerous cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by several bloom-forming cyanobacteria genera, particularly *Microcystis aeruginosa* spp. Cyanobacteria represent a public health concern because they can grow rapidly in waters rich in organic matter, under warm climate conditions, giving rise to the proliferation of “algae water blooms”. More than 80 MCs have been identified up to date (Campo and Ouahid, 2010), and microcystin-leucine-arginine (MCLR), is the most common and potent cyanotoxin. MCs promote the formation of hepatic tumors upon chronic ingestion of contaminated food or drinking water; they can also affect the kidney and the gastrointestinal tract as well as provoke headache, blurred vision, abdominal pain, nausea and vomiting (Bell and Codd, 1994).

MCs are most widely found in freshwaters (e.g. rivers, lakes, reservoirs) where they are released in substantial amounts after bacterial cell lysis or bacterial death (Amé et al., 2010). The World

Health Organization (WHO) has set a guideline value of  $1 \mu\text{g/L}$  for total MCLR in drinking water, the major route of human exposure (WHO, 2003). Possible health risks associated with recreational activities have also been investigated (Backer et al., 2008, 2010); therefore, sensitive and reliable analytical methods are required to monitor MC levels in freshwater samples.

MCs are commonly detected and quantified by reversed-phase liquid chromatography (LC) combined either with ultraviolet (UV) (ISO, 2005; Spoo et al., 2010) or with mass spectrometry (MS) detection (Bogialli et al., 2006; Cong et al., 2006; Lawrence and Menard, 2001; Mekebri et al., 2009; Neffling et al., 2009) after a previous sample pre-treatment step. Alternatively, biochemical screening methods, such as enzyme-linked immunosorbent assays (Pyo et al., 2005; Lindner et al., 2004; Mountfort et al., 2005), competitive enzyme immunoassays (Khreich et al., 2009; Long et al., 2009a) or protein phosphatase inhibition assays (Mountfort et al., 2005; Allum et al., 2008) have also been described. These assays usually require long analysis times and may be strongly affected by matrix effects. Recently, several commercial kits (EnviroGard™ Testkit, Abraxis™) and dipsticks (Lawton et al., 2010; Tippkötter et al., 2009) have become available and applied to field testing with minimum sample processing or technical expertise.

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 5147; fax: +34 91 394 4329.  
E-mail address: [mcombond@quim.ucm.es](mailto:mcombond@quim.ucm.es) (M.C. Moreno-Bondí).

However, they are single use and show detection limits over or close to the provisional guideline value established by WHO. In addition, immunosensors based on different transduction schemes, such as optical (Herranz et al., 2010; Hu et al., 2009; Lindner et al., 2009; Long et al., 2009b), electrochemical (Loyprasert et al., 2008; Yu et al., 2009) and nuclear magnetic resonance (Ma et al., 2009) measurements have been also applied to MCs analysis but they usually have limited applicability for multisample analysis.

Recent improvements in biosensor instrumentation have facilitated the commercialization of fully automated and portable devices, specially suited for field measurements, which can favorably compete with laboratory instrumental techniques (Sapsford et al., 2008). In the present study, a ready portable, low cost and easy-to-use array biosensor has been applied to MC monitoring in environmental waters. The instrument is a licensed version of a laboratory prototype of the US Naval Research Laboratory (NRL) Array Biosensor (Ligler et al., 2007) and enables on-site field applications for simultaneous multisample and/or multi-analyte detection on a single sensing surface.

The assay optimized in the present work is based on the covalent immobilization of MCLR onto the surface of a planar waveguide. Binding of anti-MCLR monoclonal antibodies to immobilized MCLR is competitively inhibited by the hepatotoxin in the sample solution. The amount of antibody bound to the patterned antigens is revealed using Cy5-labeled rabbit anti-mouse IgG, and evanescent wave excitation, and the fluorescent signal is inversely proportional to the concentration of MCLR in the samples. Several parameters affecting immunoassay performance have been optimized, including planar waveguide surface functionalization, anti-MC antibody concentration and nature of the blocking solution and regeneration solutions. The immunosensor has been applied to the simultaneous analysis of MCLR in spiked and naturally contaminated lake and river water samples and the results have been validated by HPLC–MS/MS.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and materials

MCLR was obtained from AbKem Iberia S.L. (Vigo, Spain). Microcystin-RR (MCRR), microcystin-YR (MCYR), microcystin-RR desmethylated (dm-MCRR) and monoclonal MC10E7 mouse IgG antibodies raised against MCs were provided by Alexis (Läufelfingen, Switzerland). IgG fraction monoclonal mouse anti-biotin and Cy5-conjugated affinity purified rabbit anti-mouse IgG were purchased from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA).

N-hydroxysuccinimide (NHS), 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid hydrate (MES), 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorooctyltrichlorosilane (FOTS), gelatine from porcine skin, bovine serum albumin (BSA) and D-biotin (5-[(3*a*S,4*a*S,6*a*R)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno [3,4-*d*]imidazol-4-yl]pentanoic acid) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 3-(Trimethoxysilylpropyl)diethylenetriamine (tri-amino-APMS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) were provided by Acros Organics (Geel, Belgium). Borosilicate microscope slides used as planar waveguides were purchased from Thomas Scientific (Swedesboro, USA).

MC stock solutions were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) (1 mg/mL) and stored at –20 °C. MC standard solutions for calibration purposes were prepared daily upon dilution of the stock solutions in phosphate buffered saline (PBS) (20 mM, pH 7.4) containing 0.05% of Tween 20 and 0.3% of powdered non-fat milk (PBSTM, carrier buffer). Water was purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). All other chemicals used were of analytical reagent grade.

### 2.2. Instrumentation

Fluorescence imaging was carried out using the Leopard Array Biosensor (Hanson Technologies, USA), a commercial version of the NRL Array Biosensor prototype (Ligler et al., 2007). The instrument is equipped with a 635 nm diode laser source (LAS-635-15, Lasermax). The excitation beam is focused into the edge of the microscope slide waveguide. The fluorescence array intensity developed on the slide is filtered using a long-pass (665 nm) and a band-pass filter (700 ± 35 nm) and measured using a CCD camera (Retiga 1300, Q-Imaging). The system is fully automated and uses two six-chamber reservoir modules, for the samples and tracers, respectively. The slide is mounted vertically and pressed against a six-channel gasket molded in poly(dimethylsiloxane) (PDMS, NuSil Silicone Technology), forming the six-assay flow channels. Each channel is connected on one end to a peristaltic pump and on the other to a 2-way valve that switches between the sample and the tracer that flow through the channels (Ligler et al., 2007). The acquired image is analyzed using a proprietary software control interface that also controls the microfluidic system. The locations and intensities of the fluorescent spots allow identifying and quantifying MC concentration in the samples (Taitt et al., 2008).

### 2.3. Antigen immobilization

Prior to functionalization, the microscope slides were cleaned by immersion in a 10% KOH methanolic solution for 1 h, washed with deionized water and air-dried. Dried slides were treated under argon with 2% tri-amino-APMS in anhydrous toluene for 2 h, rinsed three times with toluene and stored in anhydrous toluene at 4 °C, until use. A 15-channel PDMS patterning gasket was placed over the silanized surface of the slide, and a 30 µg/mL MCLR solution, containing 100 mM EDC and 50 mM NHS in MES (0.05 M, pH 6.0) was injected into each measuring channel. MES buffer and a solution containing 30 µg/mL biotin, 100 mM EDC and 50 mM NHS were also patterned as negative and positive controls, respectively. The slides were incubated overnight at 4 °C and rinsed with 0.5 mL of PBS (20 mM, pH 7.4). After removal of the patterning PDMS template, the slides were incubated 2 h, at room temperature, in 3% non fat milk in PBS containing 0.5% Tween 20, rinsed with deionized water, dried under argon and either used immediately or stored at 4 °C.

### 2.4. Assay protocol

The patterned slides were placed in the flow chamber of the Array Biosensor as described previously (Section 2.2). All solutions were prepared in PBSTM. MCLR standard solutions (380 µL, 0–100 µg/mL) were mixed with 20 µL of a solution containing anti-MCLR (4 µg/mL) and anti-biotin antibodies (4 µg/mL), loaded into the sample reservoirs, pumped through the channels and allowed to sit static (without flow) for 20 min. Next, the channels were rinsed twice with 0.8 mL PBSTM (1 mL/min) and the flow cells were evacuated. To reveal the anti-MCLR IgG bound to the patterned antigens, a solution (400 µL) containing 2.5 µg/mL Cy5-labeled anti-mouse IgG in PBSTM was loaded into the tracer reservoirs pumped through the channels and allowed to sit static for 20 min. Finally, the slide was rinsed four times with 0.8 mL PBSTM (1 mL/min), the flow cells were evacuated and the slide was imaged and analyzed. A solution of NaOH 50 mM (0.8 mL, 1 mL/min) was flowed for surface regeneration before a new analysis cycle. Total analysis time, including slide regeneration was, approximately, 60 min.

Fluorescent signals were extracted from the CCD images as pixel intensity values (*I*) using the proprietary software provided by Hanson Technologies. The program creates a mask consisting of data



squares (enclosing the areas where MC is patterned) and background rectangles at both sides. The net fluorescence intensity ( $S$ ) for each data square was calculated by subtracting the average background values ( $B$ ) from the average data square ( $I$ ) according to Eq. (1):

$$S = I - B \quad (1)$$

The normalized response was calculated according to the following expression (Eq. (2)):

$$\text{Normalized response} = \frac{S/S_{pc} - S_{\infty}/S_{pc,\infty}}{S_0/S_{pc,0} - S_{\infty}/S_{pc,\infty}} \quad (2)$$

where  $S_{\infty}$  is the background signal measured in the presence of an excess of MCLR,  $S_0$  is the signal in the absence of MCLR and  $S_{pc}$  is the signal measured for the positive control. The normalized response was plotted against the concentration of MCLR (in logarithmic scale), and the experimental data was fitted to a four-parameter logistic equation (sigmoidal) (Eq. (3)):

$$\text{Normalized signal} = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + ([\text{MCLR}]/IC_{50})^b} + A_{\min} \quad (3)$$

where  $A_{\max}$  is the asymptotic maximum (maximum signal in the absence of MCLR),  $b$  represents the curve slope at the inflection point,  $IC_{50}$  is the concentration of MCLR at the inflection point (concentration giving 50% inhibition of  $A_{\max}$ ), and  $A_{\min}$  is the asymptotic minimum. The detection limit (LOD) was calculated as the MCLR concentration for which antibody binding to the immobilized MCLR was inhibited by 10%, and the dynamic range (DR) of the method was evaluated as the MCLR concentration that produced a normalized signal between 20 and 80% of  $B_0$  (normalized signal in the absence of MCLR).

### 2.5. Selectivity studies

Cross-reactivity (CR) studies were carried out by measuring the competitive inhibition curves for other MC variants and non-related water pollutants, under the optimized conditions. CR was calculated according to the following equation (Eq. (4)):

$$CR = \frac{IC_{50}(\text{MCLR})}{IC_{50}(\text{cross-reacting compound})} \times 100 \quad (4)$$

### 2.6. Water sample analysis

Water sampling and MCs HPLC–MS/MS analysis were carried out by the agreement between the Spanish Ministry of Environment and Marine and Rural affairs (MARM) and the “Water Quality Laboratory” (WQL) at CEH–CEDEX on “Technical assistance, research and technological development in matters of concern of the General Directorate of Water of the MARM” (2007–2011).

Water reservoirs at four different locations in Spain ((1) León, (2) Asturias, (3) Toledo and (4) Badajoz) were sampled during the summer of 2010 (period of maximum bloom formation). Samples were collected in Pyrex borosilicate glass bottles and stored in the dark at 4 °C.

Before analysis with the array biosensor, water samples' pH and ionic strength were adjusted by the addition of PBS to a final buffer concentration of 20 mM. The samples were then filtered through a 0.45 µm nylon membrane (Whatman, Maidstone, UK) to remove suspended matter and analyzed in triplicate. Additionally, water samples free of MCs were spiked with increasing concentrations of MCLR to evaluate the matrix effect on the developed immunoassay.

For validation purposes, 10 mL subsamples were spiked with nodularin as internal standard. The samples were filtered using a 0.2 µm membrane and direct analysis of 1 mL aliquots was performed by on-line SPE LC/ESI–MS/MS at the WQL–CEH–CEDEX

(Madrid, Spain). The analyses were carried out with an E–Quan System from Thermo Fisher Scientific (San Jose, USA). This system was equipped with a high-flow Surveyor LC and a low-flow Accela LC pump; a HTC PAL autosampler (2.5 mL injections), a six-port column switching valve and a Thermo Fisher Scientific TSQ Quantum Discovery triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source (San Jose, USA). A Hypersil Gold C18 column (20 mm × 2.1 mm, 12 µm) and a Hypersil Gold C18 column (50 mm × 2.1 mm, 3 µm) (Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA) were used for preconcentration and analytical separation, respectively. The sample was loaded onto the preconcentration column (mobile phase water:acetonitrile, 97% (v/v), 1 mL/min) and after 1.3 min, the retained MCs were eluted by back-flush elution and transferred to the analytical column. The chromatographic separation was performed using gradient elution, combining solvent A (water) and solvent B (acetonitrile), both containing 0.08% (v/v) formic acid, at a flow rate of 300 µL/min, as follows: 3–30% B: 0.3 min, 30–35% B: 6 min, 35–95% B: 3 min. Finally, the columns were re-equilibrated at the initial conditions. The ESI source was operated in positive ionization mode; spray voltage 3 kV; ion transfer tube temperature 250 °C; sheath gas and auxiliary gas at flow rates of 30 and 5 a.u. (arbitrary units), respectively. Data acquisition was performed in Selected Reaction Mode (SRM) (Table 1S).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Surface derivatization

Covalent coupling of MCLR to the glass slide was carried out using triamino-APM, following activation of carboxylic groups with EDC and NHS (Hermanson, 2008). The selection of this coupling agent was based on previous reports (Smith and Chen, 2008), demonstrating the higher hydrolytic stability of aminosilanes with long alkyl chain linkers for further application of the derivatized surfaces in aqueous solutions.

The use of silane concentrations in the range of 2–4% (v/v) did not significantly affect assay sensitivity (Fig. 1S, in the supplementary material). However, increasing the silanization time from 1 to 2 h led to higher sensitivities and wider DRs ( $IC_{50}$  and LOD of 0.75 and 0.032 µg/L vs 0.95 and 0.44 µg/L for 2 and 1 h, respectively) (see Fig. 1S). Longer silanization times (16 h) significantly decreased assay sensitivity and precision, which has been attributed to the formation of aminosilane multilayers on the glass slide (Smith and Chen, 2008). For further experiments the slides were silanized using 2% (v/v) triamino-APM in toluene for 2 h and stored for no longer than 10 days.

### 3.2. MCLR immobilization.

Several parameters affecting the efficiency of the immobilization of MCLR on the silanized surface have been studied, namely: nature and pH of the carrier solution, EDC concentration, preincubation of MCLR with the EDC/NHS mixture before injecting the solution into the patterning channels and MCLR concentration (Fig. 2S). The evaluated ranges and optimum values are collected in Table 1.

### 3.3. Bioassay optimization

Several blocking methods have been evaluated to avoid the non-specific binding of bioreagents on the sensing surface: wet blocking with protein based solutions and vapor-phase blocking methods.

In the first approach, the patterned slides were blocked with solutions of gelatine, BSA or powdered non-fat milk (10 mg/mL, PBS 20 mM, pH 7.4) for 1 h at room temperature. Alternatively, vapor-phase deposition of FOTS (vp-FOTS), a highly fluorinated

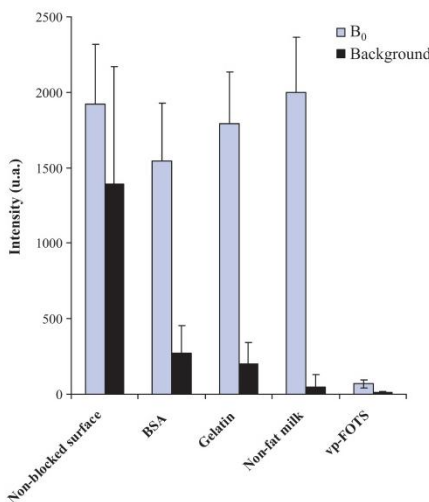
**Table 1**  
Optimized conditions for MCLR immobilization.

Parameter	Evaluated range	Optimum value
Carrier solution		
Nature	PBS and MES buffer	MES buffer
pH	5.5–6.5	50 mM, pH 6
[NaCl] (M)	0–0.5	
EDC concentration (mM)	0–200	100
Pre-incubation of MCLR with EDC/NHS (h)	0–4	0
MCLR concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	10–160	30

organosilane, was also checked. This method has been reported to be rapid and more effective than wet procedures (Hsieh et al., 2009), resulting in lower background signals and higher antibody recognition efficiencies. Thus, the sensor surface was exposed to the silane vapor, in Ar atmosphere, for 20 min, rinsed twice with toluene and dried with Ar. Blocking efficiency was determined by measuring the background signal intensity between the patterned areas, along the assay channels.

A high non-specific binding was observed without blocking (Fig. 1) and the lowest background signal was measured when using vp-FOTS, although assay sensitivity was also strongly decreased ( $B_0$  signal reduced to 5% of the value observed in the absence of blocking). This finding has been attributed to the interactions between FOTS and the guanidine residue of the immobilized MCLR, responsible of antibody recognition (Zeck et al., 2001).

Best blocking efficiencies were obtained using non-fat milk that also provided the lowest background signals (3% vs 11% and 17% for gelatine and BSA, respectively). BSA and gelatine, rendered an important decrease of assay sensitivity ( $B_0$  decreased by about 20% and 10% respectively, with respect to that of a non-blocked surface) that could be explained due to the small size of the toxin compared to that of proteins that may hinder antibody recognition by the immobilized MCLR. A correlation was observed between



**Fig. 1.** Comparison of the efficiency of different blocking solutions: BSA, gelatine, non-fat milk, vp-FOTS. The silanized slide was patterned with MCLR (30  $\mu\text{g/mL}$ ), biotin (30  $\mu\text{g/mL}$ ) as positive control, and MES buffer as negative control. Tracer solution: 2.5  $\mu\text{g/mL}$  Cy5-labeled anti-mouse IgG.

**Table 2**  
Effect of the anti-MC antibody concentration.

[Anti-MC Ab] ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOD ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a</sup>	Dynamic range ( $\mu\text{g/L}$ )
0.2	0.016 $\pm$ 0.003	0.34 $\pm$ 0.01	0.06–1.5
0.4	0.32 $\pm$ 0.02	1.12 $\pm$ 0.03	0.5–2.2
0.6	1.8 $\pm$ 0.2	3.89 $\pm$ 0.08	2.2–6.4
0.8	2.1 $\pm$ 0.2	4.15 $\pm$ 0.06	2.7–6.7

<sup>a</sup>  $t_{50}/\sqrt{n}$ ,  $t_{95\%}$ .

the molecular weight of the protein in the blocking solution and the decrease in the  $B_0$  signal, being lower in gelatine (~50 kDa) or non-fat milk solutions (mainly caseins, 23–37 kDa) than in BSA (~66 kDa) (Golden and Sapsford, 2008). Increasing non-fat milk concentration from 10 to 30 mg/mL led to more effective blocking and thus all the slides were incubated with 30 mg/mL non-fat milk for 90 min prior to use.

Immunoassays were carried out using PBS containing 0.3% non-fat milk and 0.05% Tween 20 (PBSMT) as carrier buffer (Herranz et al., 2010). Different sample incubation times were tested for optimal sensitivity. Increasing the incubation time from 10 to 20 min allowed a decrease of more than 50% in the IC<sub>50</sub> value (0.78  $\mu\text{g/L}$  and 0.34  $\mu\text{g/L}$ , respectively) but longer times did not significantly improve assay performance. Finally, an incubation time of 20 min with the Cy5-tracer antibody was also selected for assay development, as shorter times lead to both, lower signals and poorer precision.

Anti-MC antibody concentrations were evaluated in the range of 0.2–0.8  $\mu\text{g/mL}$  for optimal dose–response for MCLR samples (toxin concentration from 0 to 1  $\mu\text{g/mL}$ ) (see Table 2), as well as best LODs. Decreasing antibody concentration yields lower IC<sub>50</sub> values as well as lower LODs and narrower DRs, as expected; however, antibody concentrations lower than 0.1  $\mu\text{g/mL}$  provided a very low precision. Thus, a concentration of 0.2  $\mu\text{g/mL}$  was selected for further experiments.

Finally, to disrupt the interaction between the antibody and the immobilized MCLR and thus regenerate the biosensor surface for further assays, a 50 mM NaOH (0.8 mL, 1 mL/min) solution was used. A 5 min blocking step with non fat milk in PBS (3%, v/v) between consecutive assays, was sufficient to avoid the non-specific interactions when the slide was reused for up to fifteen assays.

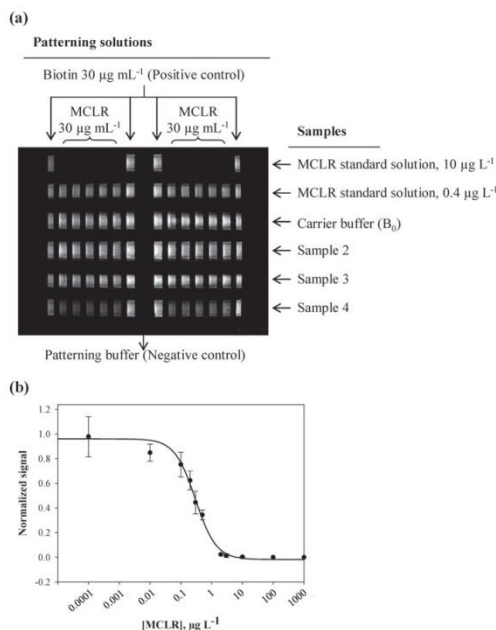
### 3.4. Biosensor characterization

#### 3.4.1. Analytical characteristics

Fig. 2 shows a representative CCD image of a patterned waveguide used to test freshwater samples and the competition inhibition curves obtained under the optimized conditions using MCLR standard solutions in the range of 0–1000  $\mu\text{g/L}$ . The fluorescent signals were normalized with respect to positive controls (biotin), as stated in Section 2.4, to account for variability between channels and slides (Kulagina et al., 2007). The IC<sub>50</sub> value and the LOD were 0.34  $\pm$  0.01  $\mu\text{g/L}$  ( $n=9$ ) and 16  $\pm$  3 ng/L ( $n=9$ ), respectively. The DR was from 0.06 to 1.5  $\mu\text{g/L}$ . The sensitivity of the developed immunosensor was superior to other reported methods for MCLR analysis (see Table 2S) and the LOD is below the provisional guideline value established by WHO for drinking water.

Reproducibility within slide channels was excellent with RSDs of the normalized signal ranging from 4 to 9%. The slide to slide reproducibility of the competitive immunoassay ( $n=3$  slides) was also good with RSDs ranging between 4 and 21% depending on the MCLR concentration (mean RSD in the calibration range 13%). The variation in biosensor response was negligible after, at least, 15 assay-regeneration cycles with no significant differences in the





**Fig. 2.** Analysis of MCs using the developed bioarray. The silanized slide was patterned with MCLR ( $30 \mu\text{g/mL}$ ), biotin ( $30 \mu\text{g/mL}$ ) as positive control, and MES buffer as negative control. The slide was assayed with MCLR ( $0, 0.4$  and  $10 \mu\text{g/L}$ ) and three river water samples (samples 2–4), in the presence of  $0.2 \mu\text{g/mL}$  of anti-MCLR and  $0.2 \mu\text{g/mL}$  of anti-biotin (positive control) antibodies. Tracer solution:  $2.5 \mu\text{g/mL}$  Cy5-labeled anti-mouse IgG. (a) Biochip image. (b) Competitive calibration curve. (Error bars are standard error of the mean for three slides and three spots per slide,  $n=9$ .)

initial  $B_0$  value (a larger number of cycles were not evaluated). This is a clear advantage over previous developments using the same sensing scheme (Ngundi et al., 2006).

#### 3.4.2. Cross-reactivity

CR was studied for the most common MC variants found in freshwater samples: MCRR, dm-MCRR and MCYR (Sivonen and Jones, 1999), obtaining CRs of 90%, 95% and 91%, respectively. Since the antibody recognizes [4-arginine]-MCs (Zeck et al., 2001) with similar sensitivities, the biosensor allows the quantification of the total concentration of the most common MCs in environmental water samples.

Non related compounds that may be present in surface waters, such as pesticides (e.g. atrazine, carbaryl) or antibacterials (e.g. enrofloxacin, chloramphenicol) were not recognized by the antibody ( $\text{CR} < 0.002\%$ ), in the studied concentration range ( $0$ – $1000 \mu\text{g/L}$ ).

#### 3.4.3. Analysis of freshwater samples

In order to investigate the presence of matrix effects, samples checked to contain undetectable levels of MCs were spiked with increasing concentrations of MCLR, in the range of  $0$ – $100 \mu\text{g/L}$  and analyzed using the immunosensor. The comparison of the dose-calibration curves obtained in these samples and in Milli Q water showed no statistically significant differences (confidence level 95%).

**Table 3**

Analysis of freshwater samples ( $n=4$ ).

Sample	MC concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	
	Biosensor	LC–MS/MS
1	<LOD	nd
2	<LOD	nd
3	$0.24 \pm 0.02$	$0.23 \pm 0.03^b$
4	$0.55 \pm 0.06$	$0.64 \pm 0.05^c$

nd, not detected.

<sup>b</sup> dm-MCRR.

<sup>c</sup> MCRR ( $0.23 \pm 0.01$ )  $\mu\text{g/L}$  + MCLR ( $0.41 \pm 0.05$ )  $\mu\text{g/L}$ .

Freshwater samples, collected from different geographic areas in Spain, were analyzed using the developed immunosensor and by on-line SPE-LC–MS/MS for validation purposes. The results are reported in Table 3. No significant differences were observed (confidence level 95%) in any of the tested samples demonstrating the excellent performance of the biosensor and its suitability for the direct analysis of MCs in surface waters at the low  $\text{ng/L}$  level, without the need of previous clean-up or preconcentration steps.

## 4. Conclusions

A biosensor consisting of MCLR covalently immobilized onto planar optical waveguides has been developed for the determination of MCLR in freshwater samples. The working principle is based on a competitive fluorimmunoassay performed within a multi-channel flow cell placed on the waveguide surface. The immunosensor allows detection of MCLR at levels below the provisional guideline value of  $1 \mu\text{g/L}$  proposed by WHO. Moreover, it shows acceptable stability, reusability (at least 15 assay-regeneration cycles with the same chip) and excellent precision. The configuration of the instrument used in this work allows the simultaneous analysis of up to six samples within short analysis times (one complete measurement-regeneration cycle can be accomplished in 60 min), and the system is fully automated, portable, and highly competitive with laboratory techniques. The  $\text{LC}_{50}$  and the LOD are lower than those reported for other biosensors based on different transduction techniques, including label-free methods such as SPR. The biosensor has shown excellent CR for other MC variants, such as MCRR, dm-MCRR and MCYR, which appear together with MCLR in environmental waters. Finally, the biosensor has been successfully applied to the direct analysis of surface water samples without any clean-up or preconcentration steps, and the results were fully comparable to those obtained by LC–MS/MS as an alternative technique.

## Acknowledgements

This work has been funded by the Spanish MEC grant CTQ2009-14565-C03, and Complutense University (GR35/10-A). S. Herranz thanks the Madrid Regional Government for a doctoral grant. The authors gratefully acknowledge A.M. Alonso García and L. Villén and the personnel from the WQL-CEH-CEDEX (Madrid, Spain) for providing the samples, performing the LC–MS/MS analysis and helpful discussions and Prof. Mayra Granda Valdés for manuscript revision.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bios.2011.12.016.

## References

- Allum, L.L., Mountfort, D.O., Gooneratne, R., Pasco, N., Goussain, G., Hall, E.A.H., 2008. *Toxicol* 52, 745–753.



- Amé, M.V., Galanti, L.N., Menone, M.L., Gerpe, M.S., Moreno, V.J., Wunderlin, D.A., 2010. *Harmful Algae* 9, 66–73.
- Backer, L.C., Carmichael, W., Kirkpatrick, B., Williams, C., Irvin, M., Zhou, Y., Johnson, T.B., Nierenberg, K., Hill, V.R., Kieszak, S.M., Cheng, Y.S., 2008. *Mar. Drugs* 6, 389–406.
- Backer, L.C., McNeel, S.V., Barber, T., Kirkpatrick, B., Williams, C., Irvin, M., Zhou, Y., Johnson, T.B., Nierenberg, K., Aubel, M., Lefrell, R., Chapman, A., Foss, A., Corum, S., Hill, V.R., Kieszak, S.M., Cheng, Y.S., 2010. *Toxicon* 55, 909–921.
- Bell, S.G., Codd, G.A., 1994. *Rev. Med. Microbiol.* 5, 256–264.
- Bogialli, S., Bruno, M., Curini, R., Di Corcia, A., Fanali, C., Laganà, A., 2006. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2917–2923.
- Cong, L., Huang, B., Chen, Q., Lu, B., Zhang, J., Ren, Y., 2006. *Anal. Chim. Acta* 569, 157–168.
- Campo, F.F., Ouahid, Y., 2010. *Environ. Pollut.* 158, 2906–2914.
- Golden, J.P., Sapsford, K.E., 2008. In: Rasooly, A., Herold, K.E. (Eds.), *Biosensors and Biodetection*. Humana Press, Hardcover, pp. 273–292.
- Hermanson, G.T., 2008. *Bioconjugate Techniques*, 2nd ed. Academic Press, USA.
- Herranz, S., Bocková, M., Marazuela, M.D., Homola, J., Moreno-Bondi, M.C., 2010. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 2625–2634.
- Hsieh, H.Y., Wang, P.C., Wu, C.W., Chieng, C.C., Tseng, F.G., 2009. *Anal. Chem.* 81, 7908–7916.
- Hu, C., Gan, N., Chen, Y., Bi, L., Zhang, X., Song, L., 2009. *Talanta* 80, 407–410.
- ISO, 2005. ISO Standard 20179:2005. Water Quality. Determination of Microcystins. Method Using Solid Phase Extraction (SPE) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Ultraviolet (UV) Detection. International Organization for Standardization, Geneva.
- Khreich, N., Lamourette, P., Renard, P.Y., Clavé, G., Fenaille, F., Créminon, C., Volland, H., 2009. *Toxicon* 53, 551–559.
- Kulagina, N.V., Shaffer, K.M., Ligler, F.S., Taitt, C.R., 2007. *Sens. Actuators B* 121, 150–157.
- Lawrence, J.F., Menard, C., 2001. *J. Chromatogr. A* 922, 111–117.
- Lawton, L.A., Chambers, H., Edwards, C., Nwaopara, A.A., Healy, M., 2010. *Toxicon* 55, 973–978.
- Ligler, F.S., Sapsford, K.E., Golden, J.P., Shriver-Lake, L.C., Taitt, C.R., Dyer, M.A., Barone, S., Myatt, C.J., 2007. *Anal. Sci.* 23, 5–10.
- Lindner, P., Molz, R., Yacoub-George, E., Dürkop, A., Wolf, H., 2004. *Anal. Chim. Acta* 521, 37–44.
- Lindner, P., Molz, R., Yacoub-George, E., Wolf, H., 2009. *Anal. Chim. Acta* 636, 218–223.
- Long, F., Shi, H.C., He, M., Sheng, J.W., Wang, J.F., 2009a. *Anal. Chim. Acta* 649, 123–127.
- Long, F., He, M., Zhu, A.N., Shi, H.C., 2009b. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2346–2351.
- Loyprasert, S., Thavarungkul, P., Asawatreratanakul, P., Wongkittisuka, B., Limsakul, C., Kanatharana, P., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 24, 78–86.
- Ma, W., Chen, W., Qiao, R., Liu, C., Yang, C., Li, Z., Xu, D., Peng, C., Jin, Z., Xu, S., Wang, L., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 25, 240–243.
- Mekebri, A., Blondina, G.J., Crane, D.B., 2009. *J. Chromatogr. A* 1216, 3147–3155.
- Mountfort, D.O., Holland, P., Sprosen, J., 2005. *Toxicon* 45, 199–206.
- Neffling, M.R., Meriluoto, J., Spoof, L., 2009. *Anal. Chim. Acta* 653, 234–241.
- Ngundi, M.M., Shriver-Lake, L.C., Moore, M.H., Ligler, F.S., Taitt, C.R., 2006. *J. Food Prot.* 69, 3047–3051.
- Pyo, D., Lee, J., Choi, E., 2005. *Microchem. J.* 80, 165–169.
- Sapsford, K., Taitt, C.R., Ligler, F.S., 2008. In: Ligler, F.S., Taitt, C.R. (Eds.), *Optical Biosensors: Today and Tomorrow*. Elsevier B.V., pp. 139–184.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. In: Chorus, I., Bratram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & F.N. Spon, London, pp. 41–111.
- Smith, E.A., Chen, W., 2008. *Langmuir* 24, 12405–12409.
- Spoof, L., Neffling, M.R., Meriluoto, J., 2010. *Toxicon* 55, 954–964.
- Taitt, C.R., Shriver-Lake, L.C., Ngundi, M.M., Ligler, F.S., 2008. *Sensors* 8, 8361–8377.
- Tippkötter, N., Stückmann, H., Kroll, S., Winkelmann, G., Noack, U., Scheper, T., Ulber, R., 2009. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 863–869.
- WHO (World Health Organization), 2003. *Cyanobacterial Toxins: Microcystin-LR in drinking water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva, 1998.
- Yu, H.W., Lee, J., Kim, S., Nguyen, G.H., Kim, I.S., 2009. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 2173–2181.
- Zeck, A., Eikenberg, A., Weller, M.G., Niessner, R., 2001. *Anal. Chim. Acta* 441, 1–13.

## Supplementary material.

**Table 1S.** MS/MS SMR parameters for the analysis of MCs in freshwater samples.

Compound	Precursor Ion (m/z)	Collision Energy (eV)	Product Ion (m/z)
Nodularin	825.3	51	135.0
MCLR	995.5	74	135.0
dm-MCRR	513.4	39	135.0
MCRR	519.7	35	135.0
MCYR	1045.5	63	135.0
MCLA	910.5	43	135.0
MCLY	1002.3	46	135.0
MCLW	1025.5	59	135.0
MCLF	986.5	51	135.0

**Table 2S.** Analytical characteristics of reported biosensors for MCs analysis.

Measuring technique	LOD (µg/L)	DR (µg/L)	Reference
SPR	0.073 ± 0.008	0.2 – 2.0	Herranz et al., 2010
SPR	1	1 – 100	Hu et al., 2009
Chemiluminescence	0.2	n.a.	Lindner et al., 2009
Nuclear magnetic resonance	0.6	1 – 18	Ma et al., 2009
Absorbance	5	n.a.	Tippkötter et al., 2009
Electrochemical	0.099	0.227 – 50	Yu et al., 2009

SPR: Surface Plasmon Resonance; n.a., not available



# LIPASE-DEXTRAN CONJUGATES AS GENERIC TOOLS FOR LOW MOLECULAR WEIGHT LIGAND IMMOBILIZATION IN MICROARRAY DEVELOPMENT

S. Herranz, M. Marciello, D. Olea, M. Hernández, C. Domingo, M. Vélez, L.A. Gheber, J.M. Guisán, M.C. Moreno-Bondi

**Analytical Chemistry**

Artículo enviado



## Dextran–Lipase Conjugates as Novel Tools for Low Molecular Weight Ligand Immobilization in Microarray Development.

*Sonia Herranz<sup>†</sup>, Marzia Marciello<sup>‡</sup>, David Olea<sup>‡</sup>, Margarita Hernández<sup>#</sup>, Concepción Domingo<sup>#</sup>, Marisela Vélez<sup>‡,¥</sup>, Levi A. Gheber<sup>§</sup>, Jose M. Guisan<sup>‡,\*</sup>, María Cruz Moreno-Bondi<sup>†,\*</sup>*

<sup>†</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutensian University, 28040 Madrid (Spain).

<sup>‡</sup>Department of Biocatalysis, Institute of Catalysis and Petroleochemistry–CSIC, 28049 Cantoblanco (Madrid, Spain).

<sup>#</sup>Instituto de Estructura de la Materia–CSIC, 28006 Madrid (Spain).

<sup>¥</sup>Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia, 28049 Cantoblanco (Madrid, Spain).

<sup>§</sup>Department of Biotechnology Engineering, Ben-Gurion University of the Negev, 84105 Beer Sheva (Israel).

### Corresponding Authors

[mcmbondi@quim.ucm.es](mailto:mcmbondi@quim.ucm.es); [jmguisan@icp.csic.es](mailto:jmguisan@icp.csic.es)

**ABSTRACT**

The development of effective array biosensors relies heavily on careful control of the density of surface immobilized ligands on the transducing platform. This paper describes the synthesis of new dextran–lipase conjugates of use for immobilizing low molecular weight haptens onto glass planar waveguides for immunosensor development. The conjugates were synthesized by immobilizing bacterial thermoalkalophilic lipases (BTL2) on agarose macroporous beads, followed by covalent coupling to dextran networks of variable molecular weight (1.5–40 kDa). The chimeras were immobilized via nonspecific hydrophobic interactions onto glass planar waveguides modified with 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane to obtain highly ordered and homogeneous molecular architectures as confirmed by Atomic Force Microscopy (AFM). Microcystin-LR (MCLR) was covalently bound to the dextran–BTL2 conjugates. The usefulness of this approach to immunosensor development was demonstrated by determining amounts of MCLR down to a few picograms per liter with an automated array biosensor and evanescent wave excitation for fluorescence measurements of attached DyLight649-labeled secondary antibody. Modifying BTL2 with dextrans of an increased molecular weight (>6 kDa) provided surfaces with an increased loading capacity that was ascribed to the production of three-dimensional surfaces by effect of the analyte binding deep in the volume leading to expanded dynamic ranges (0.09–136.56 ng L<sup>-1</sup>), lower LODs (0.007 ± 0.001 ng L<sup>-1</sup>) and also lower IC<sub>50</sub> values (4.4 ± 0.7 ng L<sup>-1</sup>). These results confirm the effectiveness of our approach for the development of high performance biosensing platforms.

**Keywords:** Dextran–lipase conjugates, Array biosensor, Microcystins, Fluoroimmunoassay, Evanescent wave.

## INTRODUCTION

Microarray technology has recently gained increasing popularity in many fields including disease fingerprinting, drug screening, toxicity assessment, cancer therapeutics and clinical diagnostics.<sup>1-3</sup> Use of these analytical tools has been promoted by their affording rapid screening and identification of a large number of specific analytes in small sample volumes in a single measurement, which reduces reagent consumption and assay costs relative to conventional techniques.

Glass microscope slides are the most common substrates for microarray fabrication by virtue of their low cost, fluorescent background, stability to high temperatures and stringent washing, and amenability to chemical functionalization.<sup>4</sup> Despite the wide commercial availability of surface modified glass slides for arraying purposes, substrate functionalization remains a critical step in microarray fabrication.<sup>5</sup> In addition, the availability of immobilization methods allowing array substrate reuse is bound to reduce production costs.<sup>6</sup>

Glass substrates functionalized with silane derivatives for further covalent attachment of the target molecule usually provide planar 2D surfaces typically exhibiting good accuracy and reliability, but also, often, low loading capacities and poor signal detection capabilities. These limitations can be partially overcome by using glass slides modified with pseudo-3D layers of materials such as dextrans, polyacrylamide gels<sup>7,8</sup> or agarose<sup>9,10</sup> that can be further modified with appropriate linkers for attachment of ligand molecules. These methodologies, which provide increased binding capacity and sensitivity, are now commercially available. However, alternative methods are still required to simplify array fabrication and expand the range of available immobilized molecules (particularly as regards low molecular weight ligands).<sup>11,12</sup>

In previous work, we developed immunosensors based on various transduction schemes for detecting microcystins (MCs) in environmental waters.<sup>13,14</sup> We found hapten immobilization onto the chip surface and homogeneity of the receptor layer to be critical in biosensor development; in fact, both factors strongly affect sensitivity, and also nonspecific binding when complex sample matrices are involved.

This paper reports a novel approach to the development of evanescent wave microarray immunosensors based on dextran-BTL2 conjugates that are retained via nonspecific hydrophobic interactions onto microscope glass slides for the covalent immobilization of microcystin LR (MCLR). Effective BTL2 modification with the polysaccharide network was confirmed by Raman and FTIR spectra. The surface of the planar waveguides after conjugate immobilization and the different immunoassay steps was characterized by AFM. The resulting microarray was used for the sensitive, selective, rapid detection of MCs by competitive inhibition and fluorescence detection.<sup>14-16</sup> The influence of the dextran molecular weight on the microarray sensitivity and analytical response range was examined, and measurements were correlated with the formation of 2D or 3D immobilization layers on the sensing platform.



## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL2), which was expressed in *E. coli*, was produced and purified as described elsewhere.<sup>17</sup> Sucrose monolaurate, hydroxylamine hydrochloride, 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), ethylenediamine (EDA), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid hydrate (MES), 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyltrichlorosilane (FOTS), 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS), dimethyldimethoxysilane (DMDMS), D-biotin, sodium hydrogen carbonate, sodium borohydride, *p*-nitrophenyl butyrate (p-NPB) and dextrans of molecular weight 1.5–40 kDa were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). HPLC-grade methanol, toluene and hexane were supplied by Panreac Quimica S.A. (Barcelona, Spain). Octyl sepharose<sup>TM</sup> was purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden).

Microcystin LR (MCLR), microcystin RR (MCRR), microcystin YR (MCYR), microcystin RR desmethylated (dm-MCRR) and monoclonal MC10E7 mouse IgG antibodies raised against MCs (anti-MC Ab) were supplied by Alexis (Läufelfingen, Switzerland). IgG fraction monoclonal mouse anti-biotin and DyLight649-conjugated affinity purified rabbit anti-mouse IgG (labeled Ab) were purchased from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). Biotin and MC stock solutions (1 mg mL<sup>-1</sup>) were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20 °C. MC standard solutions for calibration were prepared on a daily basis by diluting the stock solutions in phosphate buffered saline (PBS, 20 mM, pH 7.4) containing 0.05% Tween 20 and 0.3% powder nonfat milk (PBSTM, carrier buffer). Water was purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). All other chemicals used were analytical reagent-grade. Borosilicate microscope slides for use as planar waveguides were purchased from Thomas Scientific (Swedesboro, NJ, USA).

**Synthesis of aminated dextran–lipase conjugates.** An amount of 1 g of BTL2-octyl (1–1.5 mg BTL2 per gram of octyl sepharose) was suspended in 9 mL of 1 M EDA (pH 4.75) containing 10 mM EDC and allowed to stand for 1.5 h under gentle stirring (Figure 1Sa, Supporting Information). The suspension was then filtered and the support (aminated BTL2-octyl) washed with water and dried under vacuum. Oxidized dextran was covalently linked to aminated lipase (33.4 mg mL<sup>-1</sup>, pH 7; 9 mL per gram of aminated BTL2-octyl) for 1.5 h. The dextran was aminated by reaction with EDA (200 mM, pH 7.2) for 2 h, followed by addition of NaHCO<sub>3</sub> (final concentration 50 mM, pH 10) and solid sodium borohydride (final concentration 10 mg mL<sup>-1</sup>) and 2 h stirring. The support was filtered and washed with excess water. The aminated dextran-BTL2 conjugate was then desorbed from the octyl sepharose support by resuspension in 10 mL of 1–2% (v/v) sucrose monolaurate in phosphate buffer (PB, 5 mM, pH 7.0) at 25 °C for 1 h. Enzymatic activity was evaluated by measuring the increase in absorbance at 348 nm produced by the release of *p*-nitrophenol in the BTL2-catalyzed hydrolysis of 0.4 mM pNPB in 25 mM PB, pH 7 at 25 °C. Desorption yields spanned the range 37–40% for all dextrans except that of 40 kDa (16%). Finally, the supernatant was filtered and sucrose monolaurate hydrolyzed with *Thermomyces lanuginosa* lipase (TLL) previously immobilized onto glyoxyl-agarose,<sup>18</sup> and removed by dialysis against water. Aminated dextran–BTL2 conjugates were lyophilized and stored in a dry atmosphere at

4 °C until use. The amount of amino groups present in each conjugate was quantified by reacting it with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate and measuring the resulting absorbance at 335 nm. Concentrations ranged from 0.13 to 0.18  $\mu\text{mol/mg}$ .<sup>20</sup>

**Raman and FTIR characterization.** Raman spectra were obtained on a Bruker MultiRaman FT-Raman spectrometer equipped with a 1064 nm Nd:YAG laser excitation system and a liquid N<sub>2</sub> refrigerated high sensitivity Ge detector. A total of 400 scans at 8  $\text{cm}^{-1}$  intervals were performed. Infrared spectra were acquired with a Smiths Detection IlluminatIR FT-IR microspectrometer equipped with an MCT detector and mounted on the Leica microscope of a Renishaw RM2000 Confocal Raman system. An All Reflecting Objective (ARO) was used for this purpose. Spectral resolution was 8  $\text{cm}^{-1}$  and the acquisition time 2 min. All samples were lyophilized prior to analysis.

**Biosensor development. Instrumentation.** Fluorescent images were obtained with a Leopard Array Biosensor (Hanson Technologies, Carlisle, PA, USA), which is a commercial version of an NRL Array Biosensor prototype<sup>15,16</sup> and described elsewhere.<sup>14</sup>

*Antigen immobilization onto the sensing surface.* The glass microscope slides used as waveguides were cleaned by immersion in a 10% KOH solution in methanol (1 h), washed with deionized water and air dried. After cleaning, the slides were functionalized with FOTS (2% in anhydrous toluene, 2 h), DMDMS (2% in anhydrous toluene, 2 h) or HMDS (0.4 M silane in anhydrous hexane, overnight) under argon. Finally, the functionalized slides were rinsed three times with toluene or hexane as required and stored in anhydrous solvent (hexane or toluene) at 4°C until use.

Aminated dextran-BTL2 conjugates were hydrophobically adsorbed by using a 15-channel PDMS patterning gasket placed over the functionalized waveguide. A 0.5  $\text{mg mL}^{-1}$  conjugate solution in 10 mM PB (0.15 M NaCl, pH 7.0) was injected into each channel. After 30 min of incubation at room temperature (RT), the channels were unloaded and flushed with 0.5 mL of PB. MCLR was immobilized onto the dextran network by injecting a 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  MCLR solution containing 100 mM EDC and 50 mM NHS in MES buffer (0.05 M, pH 6.0) into each channel (Figure 1Sb). After at least 4 h incubation, the channels were unloaded and flushed with 0.5 mL of MES buffer. An MES buffer solution (0.05 M, pH 6.0) containing 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  MCLR or 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  biotin plus 100 mM EDC and 50 mM NHS was patterned as negative and positive control, respectively. Additional, control channels were used to directly immobilize MCLR onto silanized surfaces in the absence of aminated dextran-BTL2 conjugate. The patterned slides were blocked in PBS containing 0.5% Tween 20 and 3% nonfat milk for 2h, rinsed with deionized water, dried under argon and either used immediately or stored at 4 °C.

*Assay protocol.* The measuring principle of the assay was competitive inhibition between MCLR immobilized onto the chip surface and MCs present in the sample for a limited number of antibody (Ab) binding sites.

A volume of 390  $\mu\text{L}$  of MCLR standard solution was mixed with 10  $\mu\text{L}$  of Abs solution (anti-MC and anti-biotin Abs, 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). After pre-incubation at RT for 5 min, the mixture

was incubated over the sensor surface for 20 min. Next, the channels were rinsed (2 x 0.8 mL PBSTM, 1 mL min<sup>-1</sup>) and a solution containing 10 µg mL<sup>-1</sup> labeled Ab in PBSTM was incubated for 20 min in order to reveal surface bound Abs. Unbound labeled Ab was removed by rising with 0.8 mL of PBSTM (4x, 1 mL min<sup>-1</sup>). The slide was then imaged and fluorescence intensities were extracted. Finally, the sensor surface was regenerated by flowing a 50 mM NaOH solution (0.8 mL, 1 mL min<sup>-1</sup>). A whole cycle, including chip regeneration, took 60 min.

Intensity data was then extracted from the CCD images and normalized as described elsewhere.<sup>14</sup> The normalized response was plotted against the MCLR concentration on a logarithmic scale, and the experimental data was fitted to the following four-parameter sigmoidal logistic equation:

$$\text{Normalized signal} = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + \left( \frac{[\text{MCLR}]}{IC_{50}} \right)^b} + A_{\min} \quad (1)$$

where  $A_{\max}$  is the asymptotic maximum (*viz.*, the maximum signal in the absence of MCLR);  $b$  and  $IC_{50}$  are the slope of the curve and analyte concentration, respectively, at the inflection point; and  $A_{\min}$  is the asymptotic minimum. The limit of detection (LOD) was calculated as the MCLR concentration where Ab binding to immobilized MCLR was inhibited by 10%, and the dynamic range (DR) of the method as the MCLR concentrations providing a normalized signal from 20 to 80%  $A_{\max}$ .

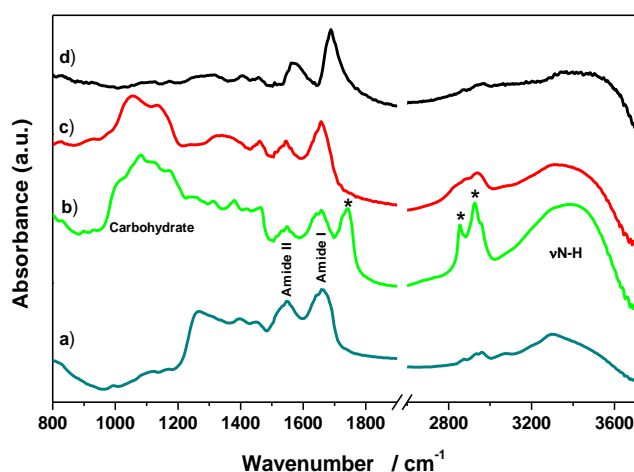
**Atomic Force Microscopy characterization.** A model 5500 microscope from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) was used for AFM imaging. Measurements were made under ambient conditions in the dynamic mode, using Olympus rectangular silicon nitride cantilevers (RC800PSA, 100 × 20 µm) with a spring constant of 0.38 N m<sup>-1</sup>, an estimated tip radius of 20 nm and a resonant frequency close to 70 kHz. The scanning rate was *ca.* 1.5 Hz. All images were second order flattened in order to correct for image “bow” due to nonlinearity in the piezoelectric scanner response. Surface root mean square roughness,  $R_q$ , was evaluated with the software Picoimage, from Agilent Technologies, in at least five different 2 × 2 µm<sup>2</sup> scans for each sample following removal of artifacts and averaging.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Synthesis and characterization of dextran–lipase conjugates.** Conjugates were synthesized by using the enzyme lipase BTL2 from *Bacillus thermocatenulatus* as protein carrier [Protein Data Base (PDB) code 2w22]. The choice of BTL2 was based on its stability at high temperatures, in alkaline media and in organic solvents, which allows this enzyme to be chemically modified and conjugated to polymeric networks.<sup>19</sup> The synthetic procedure involved immobilizing BTL2 onto a commercial octyl sepharose support; the solid phase reaction used was intended to facilitate functionalization of the enzyme without affecting the

hydrophobic pocket responsible for its catalytic activity, and also adsorption onto hydrophobic substrates. The modified enzyme retained more than 80% of its catalytic activity.

The dextran–BTL2 conjugates thus obtained were characterized by Raman and FTIR spectroscopies, and the results compared to those for unmodified BTL2. Figure 1a shows the FTIR spectrum for BTL2. As can be seen, the spectral region from 1900 to 1200  $\text{cm}^{-1}$  contained the main protein absorption bands for peptide group vibrations, namely: amide I (1700–1600  $\text{cm}^{-1}$ ), which is mainly due to C=O stretching; amide II (1580–1510  $\text{cm}^{-1}$ ), due to N–H bending and a contribution of C–N stretching; and a weaker amide III band (1400–1200  $\text{cm}^{-1}$ ) due to N–H bending, and C–C $_{\alpha}$  and C–N stretching vibrations. The 1200–900  $\text{cm}^{-1}$  region exhibited a weak absorption signal due to protein associated sugar chains.<sup>21</sup>



**Figure 1.** FTIR spectra for (a) BTL2, (b) aminated dextran–BTL2 conjugate, (c) aminated dextran–BSA conjugate and (d) BSA. (\*) Sucrose laurate bands.

As confirmed by the IR and Raman spectra, the conjugates, which were desorbed from the octyl sepharose support with sucrose laurate, contained some laurate. The strongest laurate infrared absorption (and Raman) bands by far were those in the C–H stretching region around 2900  $\text{cm}^{-1}$ , with the typical spectral profile for alkyl chains,<sup>22</sup> followed by the C=O stretching band at *ca.* 1750  $\text{cm}^{-1}$  in the infrared region. The presence of sucrose laurate residues in the samples was clearly apparent from the C=O stretching IR band at 1750  $\text{cm}^{-1}$  and the Raman band at 1730  $\text{cm}^{-1}$ ; these bands typically appear in the 1700–1800  $\text{cm}^{-1}$  region, where proteins and dextrans exhibit no signal. On the other hand, laurate exhibits much stronger Raman scatter than do proteins and polysaccharides such as dextran; therefore, the presence of laurate—even in trace amounts—in the conjugates produced strong enough bands to virtually conceal the Raman signals for the protein and polysaccharide.

Based on the previous results, we hypothesized that the dextran might have conjugated to BTL2 much like a protein of similar characteristics such as Bovine Serum Albumin (BSA).

This hypothesis was checked by using an aminated dextran–BSA conjugate in a homogeneous phase to avoid sucrose laurate. Figures 1d, 1c and 1b show the FTIR spectra for BSA, the aminated dextran–BSA conjugate and the aminated dextran–BLT2 conjugate, respectively.

The FTIR spectra for dextrans are characterized by a strong band in the 900–1200  $\text{cm}^{-1}$  region known as the “carbohydrate band”.<sup>23,24</sup> Dextran derivatives (oxidized, aminated dextrans) essentially exhibit the same FTIR spectra in the fingerprint spectral region below 1800  $\text{cm}^{-1}$ , with weak characteristic bands corresponding to various functionalities (e.g., the absorption band around 1730  $\text{cm}^{-1}$  associated to C=O bond stretching of aldehyde groups in the oxidized dextran or a peak around 1665  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to stretching of the hydrazide carbonyl group in the aminated dextran).<sup>25,26</sup>

The aminated dextran–BTL2 conjugate contained residual sucrose laurate, labeled with an asterisk in Figure 1b. Binding of the dextran backbone to BSA (or BTL2) increased signal intensity in the aliphatic C–H stretching region (3000  $\text{cm}^{-1}$ ) and carbohydrate region (900–1200  $\text{cm}^{-1}$ ), consistent with previous results for collagen–dextran blends.<sup>23</sup>

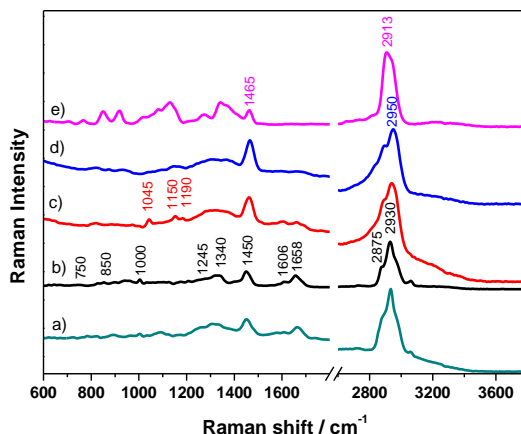
Also consistent with previous results for gelatin–polysaccharide complexes,<sup>27</sup> formation of the protein–polysaccharide complexes increased the signals in the 900–1200  $\text{cm}^{-1}$  region and caused small shifts in the protein Amide I and Amide III bands, as well as in the carbohydrate peak around 1010  $\text{cm}^{-1}$ . The presence of secondary amine groups strengthened amine N–H stretching vibrations (3300–3500  $\text{cm}^{-1}$ ). The medium–weak band for amine C–N stretching vibrations in the 1130–190  $\text{cm}^{-1}$  region overlapped with the strongest bands for dextran. In conclusion, the IR spectra were consistent with the formation of aminated dextran–BSA and aminated dextran–BTL2 conjugates spectrally similar to other glycosylated lipases.<sup>28</sup>

As can be seen from Figures 2a and 2b, the Raman spectrum for BTL2 —after subtraction of the sucrose laurate spectrum— and that for BSA were very similar. Figure 2 also shows the spectra for the dextran (e) and aminated dextran (d), as well as the aminated dextran–BSA conjugate (c).

The Raman spectra for BTL2 and BSA are typical of proteins,<sup>29</sup> with bands associated to the polypeptide backbone (Amide I, 1650  $\text{cm}^{-1}$ ), C–H deformation (1450 and 1341  $\text{cm}^{-1}$ ), Amide III (1240  $\text{cm}^{-1}$ ) and aromatic aminoacid (phenylalanine, tryptophan and tyrosine)<sup>30</sup> side chains. In particular, the characteristic narrow band at 1000  $\text{cm}^{-1}$  corresponds to the aromatic ring of phenylalanine and that at 1606  $\text{cm}^{-1}$  to in-plane stretching of the ring.

A comparison of the Raman spectra for the aminated dextran and dextran revealed a red shift in the C–H stretching bands around 2900  $\text{cm}^{-1}$ , an increased intensity in the C–H deformation band at 1465  $\text{cm}^{-1}$ , and the presence of three new bands at 1190, 1150 and 1045  $\text{cm}^{-1}$  typical of secondary amines.<sup>21</sup> There was also a small signal increase in the 3100–3400  $\text{cm}^{-1}$  region, which typically contains amine N–H stretching vibration bands.

The Raman spectrum for the aminated dextran–BSA conjugates included the typical signals for the aminated dextran and weak bands typical of BSA (e.g., amide I at 1658  $\text{cm}^{-1}$  and phenylalanine aromatic ring stretching at 1606  $\text{cm}^{-1}$ ). Therefore, the Raman data was also consistent with the formation of chimeras.



**Figure 2.** Raman spectra for (a) BTL2, (b) BSA, (c) the aminated dextran-BSA conjugate; (d) aminated dextran and (e) dextran.

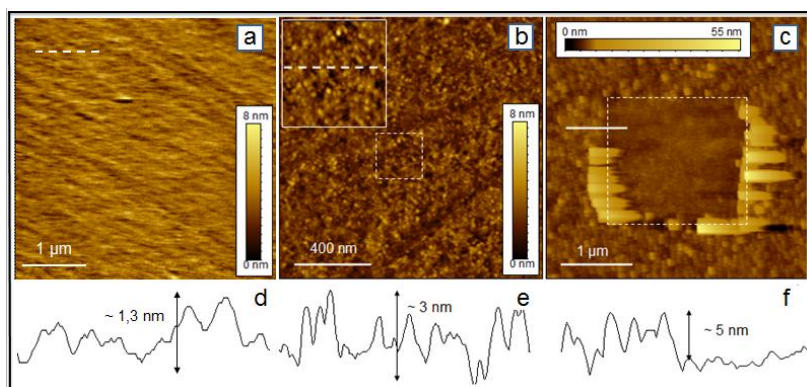
**Surface functionalization.** The sensor was constructed by immobilizing the conjugate onto glass planar waveguides. In theory, the interaction of the enzyme hydrophobic pocket with the glass surface would allow the dextran network to acquire an outward orientation facilitating further covalent coupling of MCLR.<sup>31</sup> Incubation of nonsilanized glass slides with aminated (6 kDa) dextran-BTL2 conjugates resulted in low sensitivity and poor reproducibility in the determination of MCLR, which was ascribed to the substrate hydrophilicity leading to low surface coverage. The silanizing agents HMDS, FOTS and DMDMS were tested to increase surface hydrophobicity. To this end, the resulting slides were incubated with the conjugates; this was followed by covalent immobilization of MCLR ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) as described in the Experimental Section (Figure 1Sb). The effect of the silanizing agent on biosensor sensitivity was evaluated via competitive inhibition assays involving incubating  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  anti-MC Ab in the absence and presence of MCLR ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ), using DyLight649-labeled anti-mouse IgG ( $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) as revealing agent.

As can be seen in Figure 2S (Supporting Information), FOTS and HMDS coated surfaces exhibited the strongest fluorescence signals and highest sensitivity to MCLR. However, AFM characterization of the FOTS coated slides (Figure 3S.b in the Supporting Information) revealed the formation of silane aggregates up to 50 nm high. This resulted in irreproducible conjugate immobilization and hence in poor immunoassay reproducibility.

Figure 3b shows a  $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}^2$  AFM topographic image of an HDMS-coated glass slide after incubation with BTL2 ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) for 30 min. The surface was covered by a homogeneous globular film similar to those typically observed in immobilized proteins<sup>32</sup> and having  $R_q = 0.74 \text{ nm}$ .

The overall appearance of the BTL2-modified surface (Figure 3b) was markedly different from that of the bare glass (Figure 3a) or the HDMS-functionalized glass slides (Figure 3S.a, in the Supporting Information), which was less rough —  $R_q$  was 0.42 for the former and 0.46

nm for the latter). This led us to select HMDS for waveguide silanization in subsequent tests. As suggested by the AFM results, BTL2 formed globules 1–3 nm high on the substrate in the HMDS-functionalized slides (see Figure 3e). Their  $R_q$  value, 0.74 nm, suggests the formation of a lipase monolayer.<sup>33</sup> Based on the X-ray diffraction patterns for this protein, the expected height of the lipase globules was *ca.* 5 nm.<sup>34</sup> The decreased peak-to-hole distances measured in these samples can be ascribed to the formation of compact protein films preventing the AFM tip (close to 20 nm in diameter) from spanning the entire topography of the immobilized macromolecules (Figures 3b and 3e). The globules were 20–60 nm across, but this size was increased by effect of convolution with the AFM tip.<sup>35</sup>



**Figure 3.** AFM topography of (a) a blank glass waveguide and (b) an HDMS silanized waveguide after incubation with a BTL solution ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  in PB, 30 min). The inset corresponds to a zoom of the dashed square. (c) AFM topography image of an area that was previously scanned 20 times at a high load force in the contact mode. (d) Topographic profile across the line in Figure 3a. (e) Topographic profile across the line in Figure 3b. (f) Topographic profile across the line in Figure 3b.

An area of  $2 \times 2 \text{ }\mu\text{m}^2$  was scratched by repeated scanning in the contact mode with a high load force in order to further confirm the presence of a lipase monolayer. Scratching removed the material on top of the glass surface. A larger area containing the scratched zone was then scanned in the dynamic mode. The height of the resulting hole, shown in Figure 3c, was close to 5 nm (Figure 3f), which further confirms the presence of a lipase monolayer.

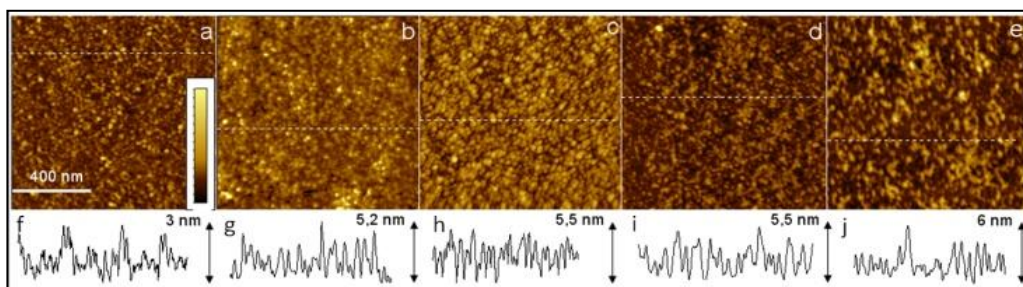
**Immobilization of dextran–lipase conjugates onto planar waveguides.** The immobilization procedure was optimized by examining the influence of the nature of the carrier solution, conjugate concentration and incubation time. Milli-Q water and two different buffers were used: PB (10–50 mM, pH 7.0) and TRIS (50 mM, pH 7.6) and the resulting surface morphology was characterized by AFM. The best results in terms of surface homogeneity were obtained with PB and water. Finally, a 10 mM PB solution at pH 7.0

containing 0.15 M NaCl was selected for the assay in order to reduce aggregation and increase conjugate solubility.<sup>20,36</sup>

The influence of the lipase concentration was examined over the range 0.5–1 mg mL<sup>-1</sup>. After 30 min incubation, the AFM technique revealed the formation of homogeneous conjugate monolayers irrespective of the enzyme concentration used. As confirmed by AFM, longer incubation times produced no conjugate multilayers, which would have led to poor coating homogeneity and less uniform MCLR density across the waveguide surface. Therefore, the slides were incubated with a 0.5 mg mL<sup>-1</sup> solution of aminated dextran–BTL2 conjugate dissolved in 10 mM PB (0.15 M NaCl, pH 7.0) for 30 min in subsequent tests. These experimental conditions facilitated the formation of a monolayer onto the silanized surface with good reproducibility between waveguides.

**Effect of the dextran molecular weight on microarray sensitivity.** Dextran networks of molecular weight spanning the range 1.5–40 kDa were bound to BTL2 in order to assess the effect of polysaccharide size on biosensor response. These polysaccharides are very flexible polymers that behave as expandable coils ( $M_w > 2000$ ) in solution. A decrease in desorption yield of the aminated dextran–BTL2 conjugate from the octyl sephadex support with increasing dextran molecular weight was observed. The maximum yield was obtained with the 1.5 kDa dextran (40%); it was slightly lower for the 6 kDa dextran (37%) and reduced to about 16% with the 40 kDa oligosaccharide. This result can be ascribed to a single polysaccharide molecule binding to several lipase neighboring molecules to form complex conjugates which may not be so readily desorbed from the sepharose support as the molecular dimensions of the dextran network are increased.

Figure 4 shows 1 x 1  $\mu\text{m}^2$  topographic images of the immobilized aminated dextran–BTL2 conjugates containing polysaccharides of increasing molecular weight.  $R_q$  was 0.66, 1.23, 1.25, 1.33 and 1.64 nm for the 1.5 kDa, 6 kDa, 9–11 kDa, 15–25 kDa and 40 kDa dextran, respectively.



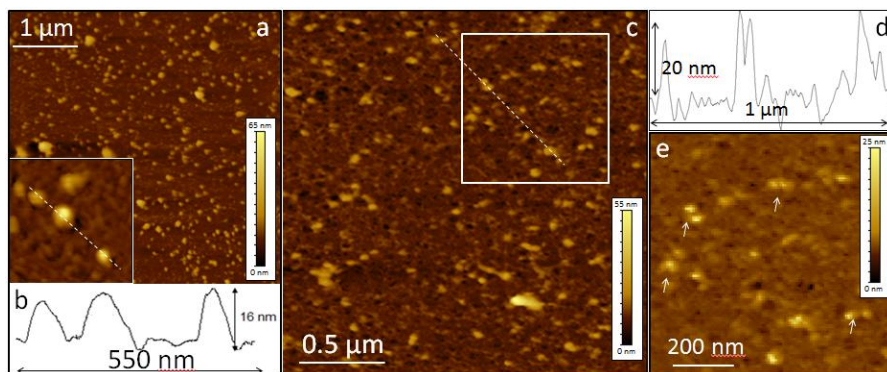
**Figure 4.** AFM topography images of an HDMS silanized waveguide coated with aminated dextran–BTL2 conjugates prepared from dextrans of variable molecular weight: (a) 1.5 kDa, (b) 6 kDa, (c) 9–11 kDa, (d) 15–25 kDa and (e) 40 kDa. Topographic profiles across the dashed lines drawn in a (f), b (g), c (h), d (i) and e (j). The topographic scale (inset) ranged from 0 to 9 nm.



The aminated (1.5 kDa) dextran–BTL2 conjugates (Figure 4a) and BTL2 (Figure 3b) had similar surface topographies, with globules 1–3 nm in size (Figure 4e) and  $R_q = 0.66$  nm. This result suggests that derivatization with the 1.5 kDa dextran had no significant effect on the enzyme dimensions, probably because of the relatively small size of the attached oligosaccharide. Immobilizing polysaccharide derivatives of higher molecular weights (6, 9–11 and 15–25 kDa) also led to homogeneously modified surfaces with globules up to 5 nm high (Figures 4g, 4h and 4i).

The topography of the sample corresponding to the waveguide surface after incubation with an aminated (40 kDa) dextran–BTL2 conjugate was markedly different from those of the other substrates (Figure 4e). Globules ranged from 1 to 6 nm in height (Figure 4j) and the intervening space exceeded 60 nm. Also,  $R_q$  increased to 1.64 nm. These results may have arisen from the increased molecular volume of the dextran molecules potentially coming into contact with neighboring dextrans and aggregating laterally to form higher, more spaced globules.

The aminated dextran-BTL2 patterned slides were incubated with MCLR ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) in MES buffer containing 100 mM EDC and 50 mM NHS to perform the competitive inhibition assays. No changes in surface topography were observed by AFM after covalent binding of MCLR to the aminated (6 kDa) dextran–BTL2 conjugate (results not shown). After incubation with anti-MC Ab (Figure 5a), the surface exhibited globules 12–22 nm high and 70–150 nm wide (see profiles in Figure 5b). These dimensions are similar to those of an IgG molecule and the slight differences are suggestive of a different orientation in the Ab molecules.  $R_q$  between Ab globules was 1.10 nm, and scratching the surface produced a 5 nm deep hole; both are consistent with the presence of a conjugate monolayer (result not shown).



**Figure 5.** (a) AFM topography image of the MCLR-(6 kDa) dextran–BTL2 sensor surface after incubation with anti-MC Ab ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 20 min). The inset is a  $500 \times 500 \text{ nm}^2$  zoom of the sample. (b) Topographic profile following the dashed line in the inset. (c) AFM topographic image of the waveguide surface after the revealing step. (d) Topographic profile following the dashed line; (e)  $0.8 \times 0.8 \mu\text{m}^2$  zoom of the square in (c). The arrows indicate the presence of globule pairs.

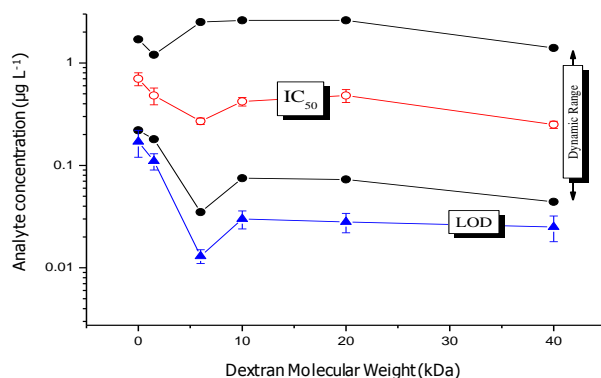
Figure 5c shows a topographic image of the sensing surface after the revealing step with labeled Ab. An increased number of globules and other variously shaped objects 16–20 nm high and 60 to a few hundred nanometers wide were observed (Figure 5d). Zooming on the surface revealed a large number of globules in pairs (Figure 5e) about 20 nm in height and 150 nm in total width that were assigned to secondary fluorescent antibodies bound to anti-MC.

Probably, the wider structures observed were protein aggregates or reflected different orientations of the labeled antibodies upon binding. The surface also contained several holes 5 nm in average height suggestive of unbound MCLR-dextran–BTL2 conjugates. Again, scratching the surface produced a hole nearly 5 nm deep that confirmed the presence of a conjugate monolayer under the antibodies (results not shown).

A control assay was conducted in parallel by directly adsorbing MCLR onto the HDMS functionalized surface (Figure 4S in the Supplementary Material). AFM revealed no significant changes after cyanotoxin immobilization. However, incubation with anti-MC Ab led to a disordered surface of polydisperse globules ranging from 10 to more than 100 nm in height (Figure 4S.a). Further incubation with labeled secondary Ab again rendered a disordered topography (Figure 4S.b) with aggregates up to 140 nm high (Figure 4S.d).

Replacing the BTL2 conjugates with MCLR-aminated (6 kDa)-dextran for slide patterning also resulted in highly disordered surfaces after incubation with anti-MC Ab (Figure 5S.a.) and after revealing with labeled secondary Ab (Figure 5S.b).

The lack of homogeneity observed confirms the suitability of dextran–BTL2 conjugates for preparing highly ordered molecular architectures for further immobilization of low molecular weight haptens on planar waveguides.



**Figure 6.** Influence of dextran molecular weight on microarray sensitivity. Solid black circles represent the DR upper and lower boundaries, open red circles  $IC_{50}$  values and blue triangles LODs (see Table 1S).

The effect of polysaccharide molecular weight on microarray sensitivity was assessed via competitive inhibition assays with toxin concentrations over the range 0–1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The resulting  $\text{IC}_{50}$  values and LODs are shown in Table 1S and Figure 6, and were significantly lower than those obtained with the aminated (6 kDa) dextran functionalized glass slides ( $\text{IC}_{50}$ :  $0.81 \pm 0.04 \mu\text{g L}^{-1}$  vs  $0.27 \pm 0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

As can be seen, the optimum dextran molecular weight was 6 kDa, which led to the broadest dynamic range by far—and also to the lowest LODs and  $\text{IC}_{50}$  values as a result.

In order to elucidate the mechanism underlying this phenomenon, we fitted the response curves for each molecular weight to a physical model describing the binding mechanism. Specifically, we used the Sips equation<sup>37</sup> to determine the Sips parameter, which is a measure of 3D binding. A detailed discussion of the Sips equation and the significance of the Sips parameter in differentiating between 2D and 3D binding is provided as supplementary information. A brief description follows. The equation for binding inhibition assays and normalized data (our case) was as follows:

$$Y = 1 - \left( \frac{c}{k + c} \right)^\alpha \quad (2)$$

where  $Y$  is the fraction of bound analyte,  $c$  the analyte concentration in solution,  $k$  the dissociation coefficient and  $\alpha$  the Sips parameter. It should be noted that, with  $\alpha = 1$ , eq. (2) converges to the Langmuir equation, which describes ideal monolayer adsorption of the analyte. With  $\alpha < 1$ , the equation describes an accumulation mechanism similar to that of adsorption of the analyte in the third dimension (depth), *i.e.*, a layer with a finite—however small—thickness as opposed to a monolayer.<sup>38</sup>

Figure 5S in the Supplementary Material summarizes these results as a plot of extracted  $\alpha$  against dextran molecular weight. With molecular weights below 6 kDa (*i.e.*, no dextran or 1.5 kDa dextran),  $\alpha = 1$  and a pure 2D binding mechanism can be assumed. At higher dextran molecular weights,  $\alpha$  was considerably lower, with a minimum (0.5) at 6 kDa. The striking resemblance of the behavior of  $\alpha$  (Figure 5S) to those of LOD,  $\text{IC}_{50}$  and DR (see Table 1S and Figure 6) leads to the following conclusion: modification with longer dextran chains creates a three-dimensional surface, thereby effectively increasing the loading capacity by effect of the analyte binding deeply in the surface and leading to a broader DR, and to lower LOD and  $\text{IC}_{50}$  values. Based on the foregoing, we chose to use the 6 kDa dextran to prepare the microarray.

**Bioassay optimization.** The effect of the MCLR concentration in the patterning solution was evaluated over the range 5–30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Increasing the MCLR concentration up to 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  increased signal intensities. Concentrations above this level failed to significantly improve biosensor response, however. A 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concentration of MCLR was thus selected for further testing. Such a low concentration should allow the cost per assay to be significantly reduced with respect to previous developments.<sup>13,14</sup> The effect of the anti-MC Ab

concentration was studied over the range 0.05–0.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  found to provide the lowest  $\text{IC}_{50}$  and LOD values, thus being selected as optimal.

The  $\text{IC}_{50}$  and LOD values obtained under the above-described optimum conditions were  $4.4 \pm 0.7 \text{ ng L}^{-1}$  ( $n = 9$ ) and  $0.007 \pm 0.001 \text{ ng L}^{-1}$  ( $n = 9$ ), respectively; also, DR was 0.09–136.56  $\text{ng L}^{-1}$ . The proposed biosensor exhibits substantially increased sensitivity relative to most existing immunosensors and limits of detection in the range  $10^3 - 16 \text{ ng L}^{-1}$ .<sup>(14)</sup> Error! No se encuentra el origen de la referencia.<sup>39–43</sup> Thus, it affords MCLR detection at the nanogram-per-liter level, which is well below the provisional guideline value for drinking water established by WHO.

Reproducibility within slide channels was good (RSD for the normalized signal ranged from 5 to 15% depending on the particular MCLR concentration). Slide to slide reproducibility in the competitive immunoassay (3 slides per run) was also good, with  $\text{RSD} \leq 23\%$  —the mean RSD in the calibration range was 16 %. Long term sensor stability was assessed by measuring the fluorescence intensity in the absence and presence of 10  $\text{ng L}^{-1}$  MCLR under the optimum conditions. As shown in Figure 7S, no significant differences at the 95% confidence level in biosensor response were observed over a period of 10 days after preparation of the waveguides. Moreover, changes in biosensor response after at least 10 assay regeneration cycles—the maximum number studied—were negligible and differences in the signal in the absence of MCLR were not statistically significant at the 95% confidence level.

Cross-reactivity in terms of the  $\text{IC}_{50}$  ratio of MCLR to each potentially interfering compound was examined for the three MC variants most commonly encountered in freshwater samples apart from MCLR<sup>44</sup> and found to be 92%, 98% and 88% for MCRR, dm-MCRR and MCYR, respectively. Because Ab recognizes [4-arginine]-MCs with a similar sensitivity,<sup>45</sup> our biosensor allows the total concentration of the most common MCs in environmental water samples to be quantified.

## CONCLUSIONS

As confirmed by AFM imaging, dextran–BTL2 conjugates are effective for preparing highly ordered and homogeneous molecular architectures on planar waveguide substrates. As also confirmed by AFM, these chimeras can be further functionalized with low molecular weight haptens such as MCLR without compromising the stability of the conjugate monolayer. These platforms can be used to develop immunosensor arrays for fluorescence measurements. Surface modification with conjugates bearing dextrans with molecular weights  $\geq 6 \text{ kDa}$  provides a three-dimensional layer, thereby effectively increasing the loading capacity by effect of the analyte binding to the polymeric structure as opposed to the surface alone and hence leading to a broader DR, and lower LODs and  $\text{IC}_{50}$  values, in immunoassays.

Research into the potential use of this approach for preparing multianalyte microarrays for detecting low molecular weight molecules including patterning slides with dextran–BTL2 conjugates previously functionalized with the desired hapten is currently under way. This strategy provides an alternative approach to controlling surface functionalization with a view

to preparing high density receptor layers on glass microscope slides largely independent of surface morphology.

## ASSOCIATED CONTENT

**Supporting Information.** Analytical performance of microarrays prepared by patterning MCLR or MCLR-dextran-BTL2 conjugates of variable molecular weight on planar waveguides; Scheme of the synthesis of dextran-BTL2 conjugates and waveguide functionalization; Effect of silane functionalization of the planar waveguide on biosensor response; AFM topography of nonsilanized and glass waveguides; AFM topography of an HMDS functionalized waveguide patterned with MCLR during the immunoassay steps; Sips parameter ( $\alpha$ ) as a function of dextran molecular weight; Variation of the evanescent field intensity and layer thickness as a function of the distance from the glass support. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

[mcmbondi@quim.ucm.es](mailto:mcmbondi@quim.ucm.es); [jmguisan@icp.csic.es](mailto:jmguisan@icp.csic.es)

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Spain's Ministry of Education and Science (Project CTQ2009-43014565-C03) and Complutense University (GR35/10-A). S. Herranz thanks the Madrid Regional Government for award of a PhD contract. D.O. acknowledges the JAE program of CSIC and the European Social Fund.

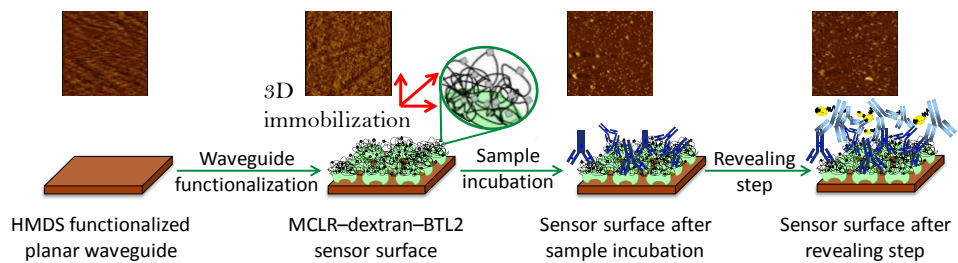
## REFERENCES

- (1) Donhauser, S. C.; Niessner, R.; Seidel, M. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 3153.
- (2) Arrabito, G.; Pignataro, B. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 5450.
- (3) Dill, D.; Hui Liu, R.; Grodzinski, P. (Eds.) *Microarrays. Preparation, Microfluidics, Detection Methods, and Biological Applications*. Springer Science, New York, **2009**.
- (4) North, S. H.; Lock, E. H.; King, T. R.; Franek, J. B.; Walton, S. G.; Taitt, C. R. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 406.
- (5) Wu, H.; Ge, J.; Uttamchandani, M.; Yao, S. Q. *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 5664.
- (6) Valles-Miret, M.; Bradley, M. *Tetrah. Lett.* **2011**, 52, 6819.
- (7) Miller, J. C.; Zhou, H.; Kwekel, J.; Cavallo, R.; Burke, J.; Butler, E. B.; Teh B. S.; Haab, B. B. *Proteomics* **2003**, 3, 56.
- (8) Ramakrishnan, R.; Dorris, D.; Lublinsky, A.; Nguyen, A.; Domanus, M.; Prokhorova, A.; Gieser, L.; Touma, E.; Lockner, R.; Tata, M.; Zhu, X.; Patterson, M.; Shippy, R.; Sendera T. J.; Mazumder, A. *Nucleic Acid Res.* **2002**, 30, e30.
- (9) Afabassiev, V.; Hanemann, V.; Wölfl, S. *Nucleic Acid Res.* **2000**, 28, e66.

- (10) Koch, C. A.; Li, P. C. H.; Utkhede, R. S. *Anal. Biochem.* **2005**, 342, 93.
- (11) Löfås, S.; Mcwhirter, A. *Springer Ser. Chem. Sensors Biosens.* **2006**, 4, 117.
- (12) Gesellchen, F.; Zimmermann, B.; Herberg F. W. *Direct Optical Detection of Protein–Ligand Interactions in Protein Ligand interactions. Methods and applications.* Nienhaus G. U. (Ed.), Humana Press, Totowa (NJ), **2005**.
- (13) Herranz, S.; Bocková, M.; Marazuela, M. D.; Homola, J.; Moreno-Bondi, M. C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, 2625.
- (14) Herranz, S.; Marazuela M. D.; Moreno-Bondi, M. C. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 33, 50.
- (15) Feldstein, M. J.; Golden, J. P.; Rowe, C. A.; MacCraith, B. D.; Ligler, F. S. *Biomed. Microdevices* **1999**, 1, 139.
- (16) Ligler, F. S.; Sapsford, K. E.; Golden, J. P.; Shriver-Lake, L. C.; Taitt, C. R.; Dyer, M. A.; Barone, S.; Myatt, C. J. *Anal. Sci.* **2007**, 23, 5.
- (17) Schmidt-Dannert, C.; Rúa, M. L.; Atomi, H.; Schmid, R. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1301, 105.
- (18) Marciello, M.; Mateo, C.; Guisán, J. M. *Colloids Surf., B* **2011**, 84, 556.
- (19) Carrasco-López, C.; Godoy, C.; de las Rivas, B.; Fernández-Lorente, G.; Palomo, J. M.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R.; Martínez-Ripoll, M.; Hermoso, J. A. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 4365.
- (20) Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*. 2nd ed., Academic Press, USA, **2008**.
- (21) Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. 3rd ed., Wiley and Sons, Chichester, **2001**.
- (22) <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- (23) Dumitrascu, M.; Meltzer, V.; Sima, E.; Virgolici, M.; Albu, M. G.; Ficai, A.; Moise, V.; Minea, R.; Vancea, C.; Scarisoreanu, A.; Scarlat, F. *Dig. J. Nanomater. Bios.* **2011**, 6, 1793.
- (24) Ombelli, M.; Eckmann, D. M.; Composto, R. J. *MRS Proceedings* **2003**, 774, O7.25.
- (25) Maia, J.; Ferreira, L.; Carvalho, R.; Ramos, M. A.; Gil, M. H. *Polymer* **2005**, 46, 9604.
- (26) Tan, H.; Hu, X. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, 126, E180.
- (27) Trott, G. F.; Woodside, E. E. *J. Colloid Interf. Sci.* **1971**, 36, 40.
- (28) Natalello, A.; Ami, D.; Brocca, S.; Lotti, M.; Doglia, S. M. *Biochem. J.* **2005**, 385, 511.
- (29) Tuma, R. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, 36, 307.
- (30) Fischer, W. B.; Eysel, H. H. *Spectrochim. Acta A* **1992**, 48, 725.
- (31) Palomo, J. M.; Segura, R. L.; Fernández-Lorente, G.; Pernas, M.; Rua, M. L.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R. *Biotechnol. Prog.* **2004**, 20, 630.
- (32) Laszlo, J. A.; Evan, K. O. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, 48, 84.
- (33) Kosaka, P. M.; Kawano, O. A.; El Seoud, O. A.; Petri, D. F. S. *Langmuir* **2007**, 23, 12167.
- (34) Carrasco-López, C.; Godoy, C.; De las Rivas, B.; Fernández-Lorente, G.; Palomo, J. M.; Guisan, J. M.; Fernández-Lafuente, R.; Martínez-Ripoll, M.; Hermoso, J. A. *Acta Cryst.* **2008**, F64, 1043.
- (35) Markiewicz, P.; Goh, M. C. *J. Vac. Sci. Technol. B* **1995**, 13, 1115.

- (36) Rúa, M. L.; Schmidt-Dannert, C.; Wahl, S.; Sprauer, A.; Schmid, R. D. *J. Biotechnol.* **1997**, 56, 89.
- (37) Sips, R. *J. Chem. Phys.* **1948**, 16, 490.
- (38) Tsarfati-BarAd, I.; Sauer, U.; Preininger, C.; Gheber, L. A. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 3774.
- (39) Hu, C.; Gan, N.; Chen, Y.; Bi, L.; Zhang, X.; Song, L. *Talanta* **2009**, 80, 407.
- (40) Lindner, P.; Molz, R.; Yacoub-George, E.; Wolf, H. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 636, 218.
- (41) Ma, W.; Chen, W.; Qiao, R.; Liu, C.; Yang, C.; Li, Z.; Xu, D.; Peng, C.; Jin, Z.; Xu, S.; Wang, L. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 25, 240.
- (42) Tippkötter, N.; Stückmann, H.; Kroll, S.; Winkelmann, G.; Noack, U.; Scheper, T.; Ulber, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 394, 863.
- (43) Yu, H. W.; Lee, J.; Kim, S.; Nguyen, G. H.; Kim, I. S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 394, 2173.
- (44) Sivonen, K., Jones, G. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chorus, I., Bratram, J. (Eds.); E & F.N. Spon, London, **1999**, Chpt 3, p. 41.
- (45) Zeck, A.; Eikenberg, A.; Weller, M. G.; Niessner, R. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 441, 1.

For TOC only





## Supporting Information

### Dextran–Lipase Conjugates as Novel Tools for Low Molecular Weight Ligand Immobilization in Microarray Development.

*Sonia Herranz<sup>†</sup>, Marzia Marciello<sup>‡</sup>, David Olea<sup>‡</sup>, Margarita Hernández<sup>#</sup>, Concepción Domingo<sup>#</sup>, Marisela Vélez<sup>‡,¥</sup>, Levi A. Gheber<sup>§</sup>, Jose M. Guisan<sup>‡,\*</sup>, María Cruz Moreno-Bondí<sup>‡,\*</sup>*

<sup>†</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutensian University, 28040 Madrid (Spain).

<sup>‡</sup>Department of Biocatalysis, Institute of Catalysis and Petroleochemistry–CSIC, 28049 Cantoblanco (Madrid, Spain).

<sup>#</sup>Instituto de Estructura de la Materia–CSIC, 28006 Madrid (Spain).

<sup>¥</sup>Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia, 28049 Cantoblanco (Madrid, Spain).

<sup>§</sup>Department of Biotechnology Engineering, Ben-Gurion University of the Negev, 84105 Beer Sheva (Israel).

\* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: [mcmbondi@quim.ucm.es](mailto:mcmbondi@quim.ucm.es); [jmguisan@icp.csic.es](mailto:jmguisan@icp.csic.es)

This file includes:

Table 1S, 2S

Figures 1S - 7S

## Supporting Information

**Table 1S.** Analytical performance of microarrays prepared by patterning MCLR or MCLR-dextran-BTL2 conjugates, of various molecular weights, on planar waveguides.

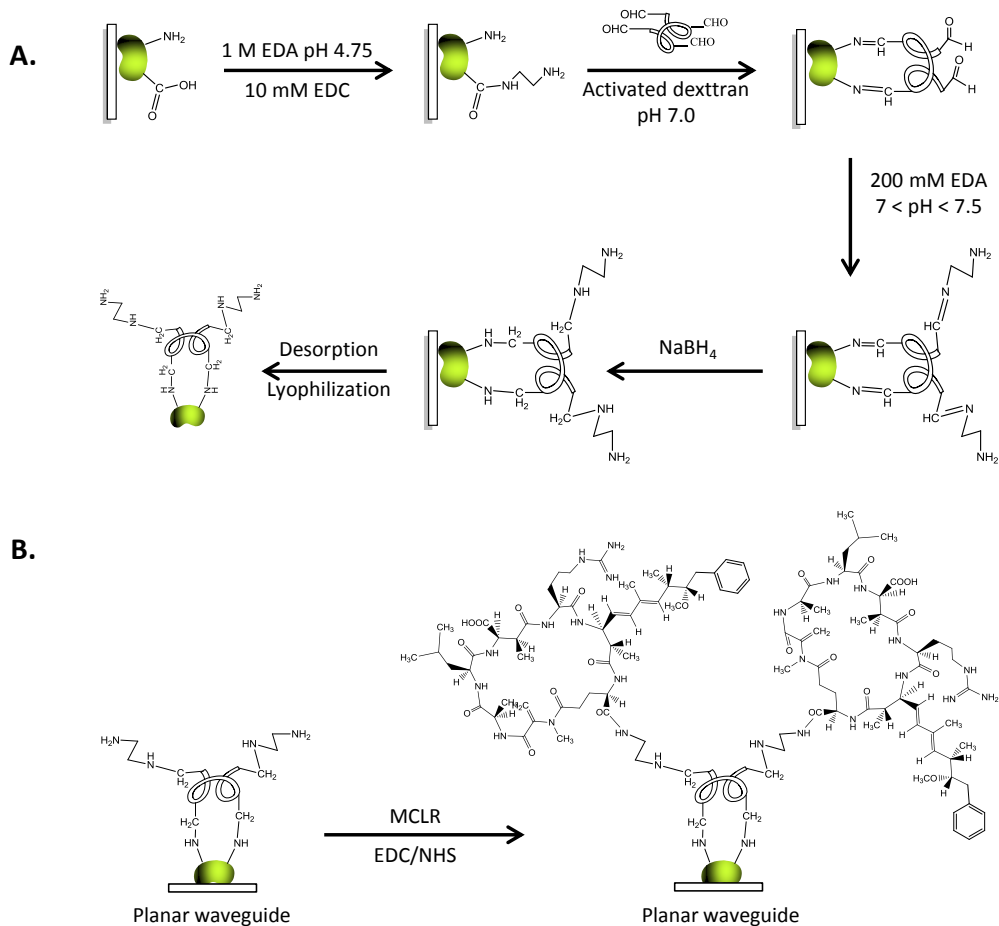
	MCLR patterning	Covalent MCLR immobilization on aminated dextran–BTL2 conjugates				
		1.5 kDa	6.0 kDa	9–11 kDa	15–25 kDa	40 kDa
LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	$0.17 \pm 0.05$	$0.11 \pm 0.02$	$0.013 \pm 0.002$	$0.030 \pm 0.006$	$0.028 \pm 0.006$	$0.025 \pm 0.007$
IC <sub>50</sub> , $\mu\text{g L}^{-1}$	$0.7 \pm 0.1$	$0.48 \pm 0.09$	$0.27 \pm 0.02$	$0.42 \pm 0.04$	$0.48 \pm 0.07$	$0.25 \pm 0.02$
DR, $\mu\text{g L}^{-1}$	$0.22 - 1.7$	$0.18 - 1.2$	$0.035 - 2.5$	$0.075 - 2.6$	$0.073 - 2.6$	$0.044 - 1.4$

[MCLR]<sub>patterning</sub> = 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [anti–MC antibody] = 0.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; n = 3 calibration plots ( $\pm$  ts/ $\sqrt{n}$ , 95% confidence limit)

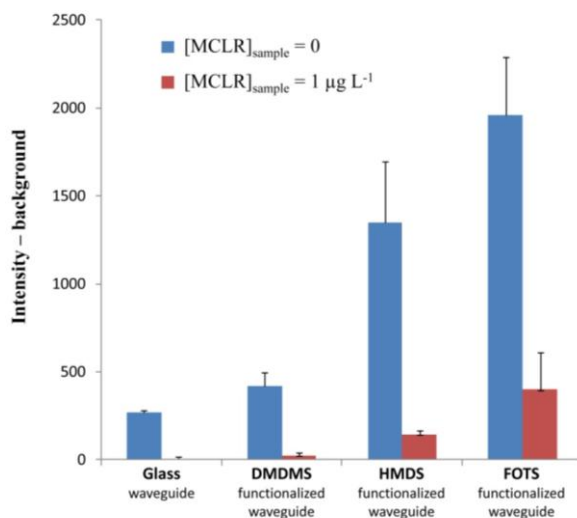
**Table 2S.** Analytical performance of microarrays prepared by patterning MCLR on aminated-(6 kDa)-dextran functionalized planar waveguides. [MCLR]<sub>patterning</sub> = 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [anti–MC antibody] = 0.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; n = 9 calibration plots.

	Covalent MCLR immobilization on aminated dextran(6 kDa)–functionalized waveguide
LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	$0.10 \pm 0.02$
IC <sub>50</sub> , $\mu\text{g L}^{-1}$	$0.81 \pm 0.04$
DR, $\mu\text{g L}^{-1}$	$0.24 - 2.2$

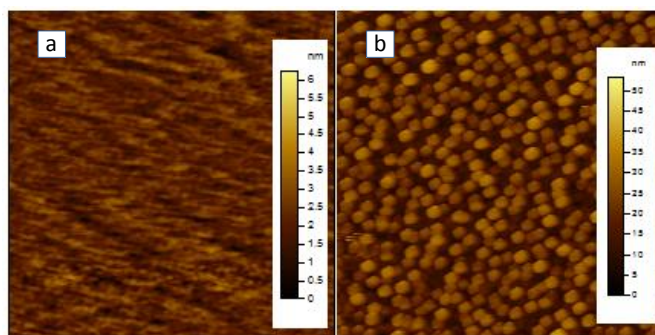
( $\pm$  ts/ $\sqrt{n}$ , 95% confidence limit)



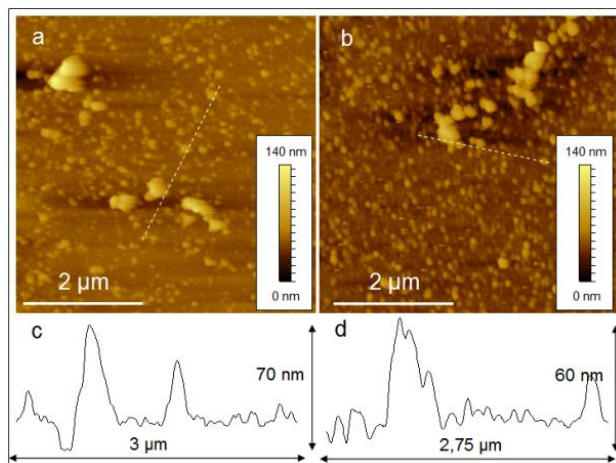
**Figure 1S.** (a) Scheme of the synthesis of dextran-BTL2 conjugates. (b) Waveguide functionalization with the MCLR-dextran-BTL2 conjugates.



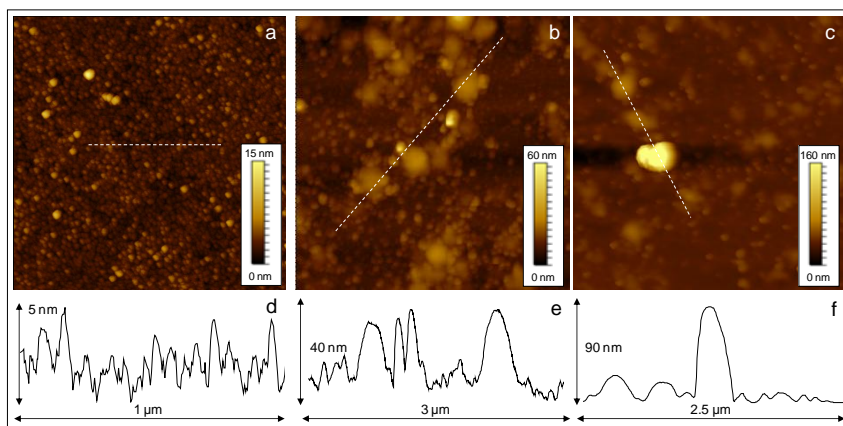
**Figure 2S.** Effect of silane functionalization of the planar waveguide on biosensor response. [aminated (6 kDa)dextran–BTL2 conjugate] = 0.5 mg mL<sup>-1</sup>; [MCLR]<sub>patterning</sub> = 30 µg mL<sup>-1</sup>; [Anti–MC Ab] = 0.2 µg mL<sup>-1</sup>; [Labelled–Ab] = 2.5 µg mL<sup>-1</sup>; n = 3.



**Figure 3S.** AFM topography of (a) HDMS silanized glass waveguide and (b) FOTS silanized glass waveguide.



**Figure 4S.** AFM topography corresponding to a HMDS functionalized waveguide patterned with MCLR: (a) after incubation with anti-MC Ab,  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (20 min); (b) after the revealing step with the labeled Ab,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (20 min). (c) and (d) show the topography profiles following the lines in (a) and (b), respectively.

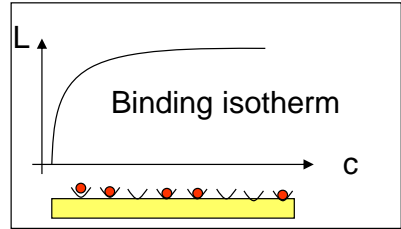


**Figure 5S.** (a) AFM topographic image corresponding to an aminated-(6 kDa)-dextran functionalized waveguide. (b) AFM topographic image of the MCLR-(6 kDa) dextran sensor surface after incubation with anti-MC Ab ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 20 min). (c) AFM topographic image of the waveguide surface after the revealing step. (d) Topographic profile following the dashed line in a. (e) Topographic profile following the dashed line in b. (f) Topographic profile following the dashed line in c.

### Sips equation: a discussion

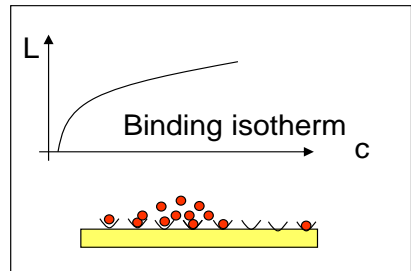
Two extreme limits are known in what concerns description of binding mechanisms of a ligand to a surface (adsorption).

1. The Langmuir model, assuming all binding sites bind the ligand with an equal binding energy, and are able to bind one ligand each (the binding energy of a binding site vanishes once a ligand is bound). The Langmuir equation (S1) describes the formation of a monolayer, with a clear saturation behavior once all the binding sites are occupied by ligands.



$$(S1) \quad L = L_{\max} \frac{k_A C}{1 + k_A C} = L_{\max} \frac{C}{k_D + C}$$

2. The Freundlich model (S2), an empirical model describing, however, very successfully multi-layer adsorption of ligands, a so-called “piling-up” kind of adsorption. In the Freundlich limit, the adsorbed layer does not saturate, albeit it builds up at slower pace, as it grows.



$$(S2) \quad L = (kC)^\alpha$$

The Freundlich equation suffers from two drawbacks: a. it never saturates, a non-physical effect, and b. it is empirical, thus the underlying mechanism leading to this kind of behavior is unclear. These drawbacks led Robert Sips (J. Chem. Phys. 16 (5), 1948) to develop a model that is also known as the Langmuir-Freundlich equation.

3. In his seminal paper (cited above), Sips is looking for the distribution of binding energies leading to a binding isotherm such as the Freundlich (empirical) model. As a result, he formulates the Sips equation (S3):

$$(S3) \quad L = L_{\max} \frac{(kC)^\alpha}{1 + (kC)^\alpha}$$

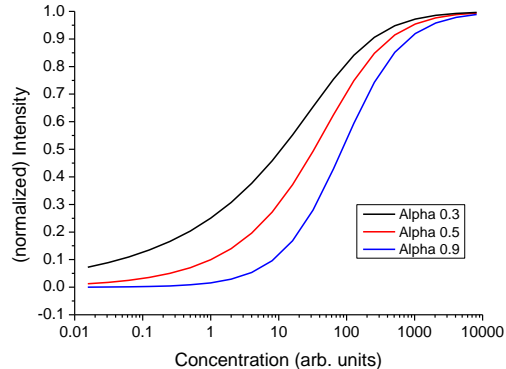
later re-written in a more compact way as (S4):

$$(S4) \quad L = L_{\max} \left( \frac{c}{k + c} \right)^{\alpha}$$

which is the complementary of equation (2) in the manuscript (in our case, an inhibition assay). The importance of the Sips equation is its ability to describe both extremes treated by Langmuir and Freundlich, and all the regimes in-between, as a function of a single parameter,  $\alpha$ . As is evident from equation S3, for  $\alpha=1$ , the Sips equation reduces to the Langmuir equation (S1). However, for low concentrations, such that  $kC \ll 1$ , it reduces to Freundlich equation (S2), with the added advantage, of course, that it saturates at high concentrations ( $kC \gg 1$ ). The parameter  $\alpha$  describes a distribution of binding sites that is extremely narrow ( $\alpha$  function) for  $\alpha=1$  (consistent with the Langmuir model), and increasingly broader (and resembling a Gaussian distribution) as  $\alpha$  becomes smaller ( $\alpha=0$  is non-physical, yielding a uniform distribution of binding energies).

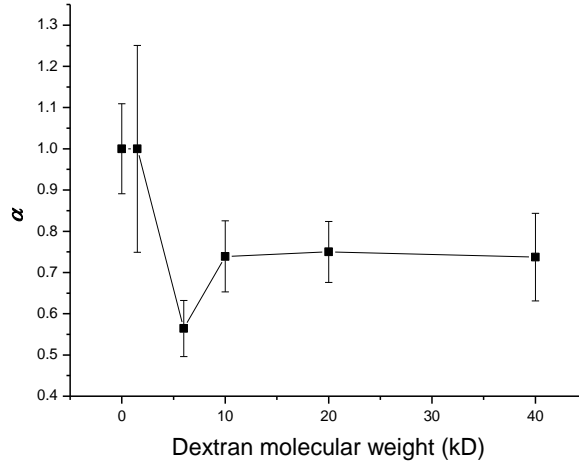
Thus, an  $\alpha$  value close to 1 describes a monolayer-like binding mechanism, close to the ideal Langmuir model, while an  $\alpha$  value significantly lower, describes a wide distribution of binding energies and results in an equation closer to the Freundlich equation, which describes and accumulation (“pile-up”) binding mechanism, as expected in a 3D fashion of stacking.

Moreover,  $\alpha$  measures the slope of the adsorbed ligand fraction vs. free ligand fraction. In a fluorescence detection scheme, it describes the slope of fluorescence intensity vs. analyte concentration curve, as demonstrated in the adjacent figure. The lower the value of  $\alpha$ , the more 3D the binding mechanism is, leading to a shallower slope of the “linear” portion of the curve, and thus an increased dynamic range.

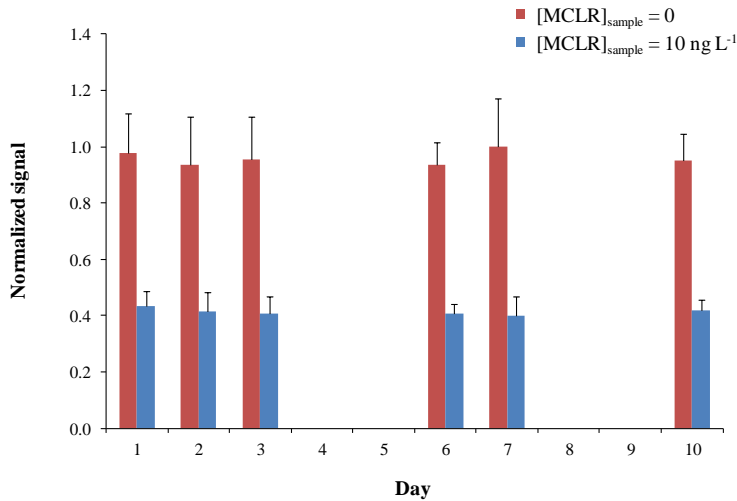


This is precisely what we are observing, as we increase the molecular weight of dextran: an optimal (low) value of  $\alpha$  for 6 kDa dextran.

This analysis rules out the possibility that we are observing simply a higher density of binding sites, however still in 2D. In terms of the equations presented above, a higher density of binding sites merely changes the value of “ $L_{\max}$ ”. A higher density of binding sites will not, however influence the parameter  $\alpha$ . A mere increase of binding site density will not change our curves, because they are normalized between 0 to 1. The change in their slope ( $\alpha$ ), though, clearly indicates an increasing binding in 3D, in the volume of the layer.



**Figure 6S.** The Sips parameter  $\alpha$  as a function of dextran molecular weight.  $\alpha = 1$  indicates monolayer (Langmuir-like) binding, while smaller  $\alpha$  values indicate progressively 3D binding.



**Figure 7S.** Biosensor response, in the optimum conditions, in the absence and in the presence on 10 ng L<sup>-1</sup> MCLR over a period of 10 days after waveguide preparation ( $n = 9$ ).





## DISCUSIÓN INTEGRADORA

---



### 5.1. Desarrollo de un método de tratamiento de muestra basado en extracción con disolventes presurizados (PLE), para el análisis de residuos de fluoroquinolonas en huevos.

Como se ha indicado en la Introducción del presente trabajo de Tesis, el empleo rutinario de antibióticos de uso veterinario en granjas representa un riesgo potencial para los consumidores, cuando no se aplican la dosis y/o el modo de modo de administración adecuados. Por otra parte, es necesario conocer la farmacocinética de estos medicamentos y establecer los periodos de espera necesarios para garantizar su eliminación por parte del organismo del animal, de forma que los productos alimenticios derivados del mismo sean seguros para el consumidor.

El análisis de FQs en muestras de huevo es bastante complejo, ya que los antibióticos pueden unirse a lipoproteínas y formar emulsiones o espumas en presencia del disolvente de extracción, lo que conduce a la extracción deficiente de los analitos, y disminuye la reproducibilidad y la sensibilidad del análisis [223].

La extracción PLE, si bien requiere una inversión económica inicial elevada, es una técnica relativamente sencilla de aplicar en los laboratorios de forma rutinaria, que permite llevar a cabo, mediante un proceso automático, la extracción de los analitos de interés de las muestras de huevo mediante la aplicación de elevadas presiones y temperaturas. El empleo de altas temperaturas acelera la cinética de extracción y un aumento de la presión mantiene al disolvente por debajo de su temperatura de ebullición, lo cual permite realizar extracciones más rápidas y eficaces, con un menor consumo de disolvente, en comparación con las técnicas clásicas [547], reduciendo el tiempo y coste de análisis.

En la presente Tesis se ha desarrollado un método de análisis basado en extracción **PLE** y posterior análisis cromatográfico con detección fluorescente (**HPLC-FLD**), para su aplicación a la detección y cuantificación de residuos de enrofloxacino (**ENRO**), ciprofloxacino (**CIPRO**) y sarafloxacino (**SARA**) en huevos. El objetivo final de esta investigación era disponer de un método de fácil aplicación en cualquier laboratorio analítico, reduciendo tanto el tiempo y coste de los análisis como la manipulación de la muestra, para comprobar la ausencia de residuos de antibióticos FQs en huevos, garantizando que este alimento llega al consumidor libre de trazas de estos medicamentos, tal y como se contempla en el principio de tolerancia cero establecido para esta matriz.

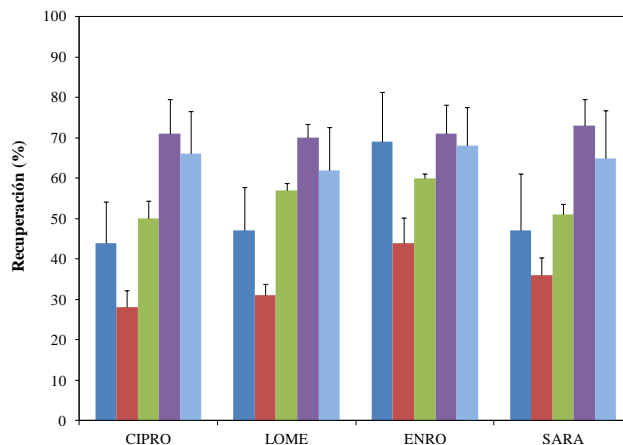
Uno de los principales parámetros que afecta al rendimiento de la extracción PLE es el disolvente o **medio de extracción**. La elección se realiza, generalmente, considerando su capacidad para extraer los analitos de interés (relacionada con la solubilidad de los mismos), minimizando la co-extracción de otros componentes de la matriz y en función de su compatibilidad con las etapas posteriores del análisis (i.e. preconcentración y análisis cromatográfico). En el caso de las FQs, al ser sustancias anfóteras, el pH del medio de extracción juega un papel decisivo en el rendimiento del proceso. Así, se evaluó el empleo de disolventes orgánicos (metanol y acetonitrilo) puros o combinados con ácido ortofosfórico (50 mM, pH 3.0). Ácidos fuertes, como el ácido clorhídrico o el ácido nítrico, son incompatibles con la extracción PLE dado que, a elevadas temperaturas, estos compuestos pueden oxidar el acero de las células de extracción y dañar el resto de los componentes del sistema.

Las condiciones de extracción empleadas durante los ensayos de optimización del disolvente de extracción se muestran en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Condiciones de extracción PLE empleadas durante la optimización del disolvente de extracción.

Parámetro	Valor
Medio de extracción	a. MeOH b. AcN c. MeOH:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1:1, v/v) d. AcN:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1:1, v/v) e. AcN:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (3:7, v/v)
Volumen célula	11 mL
Flush <sup>1</sup>	50 %
Temperatura	60 °C
Presión	1500 psi
Tiempo de calentamiento	5 min
Número de ciclos	3 (5 min/ciclo)
Tiempo de purga	60 s

<sup>1</sup>Volumen de disolvente utilizado en el proceso, calculado en referencia al volumen la célula de extracción. Para una célula de 11 mL se emplean ~11 mL de disolvente para el llenado de la misma, junto con 5.5 mL adicionales (50 % del volumen de la célula), 1.8 mL en cada uno de los 3 ciclos. Esto hace un volumen total de ~16.5 mL. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: ácido ortofosfórico 50 mM, pH 3.

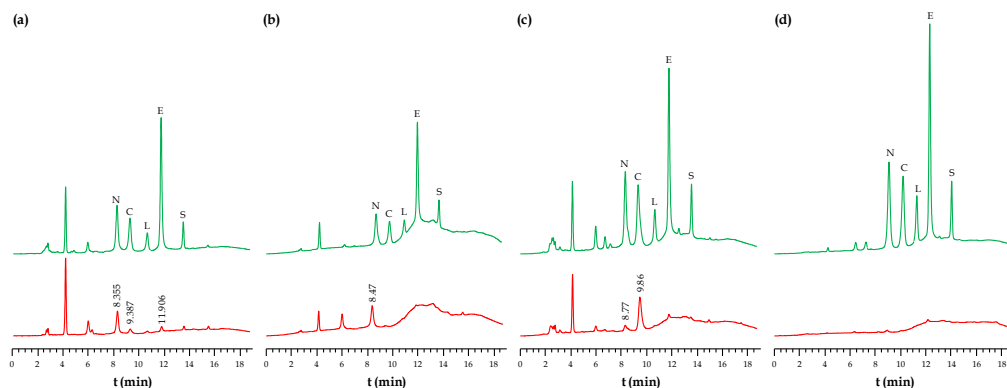


**Figura 21.** Efecto del medio de extracción sobre la eficacia de extracción de las FQs: (■) MeOH; (■) AcN; (■) MeOH/ácido fosfórico 50 mM, pH 3.0 (1:1, v/v); (■) AcN/ácido fosfórico 50 mM, pH 3.0 (1:1, v/v); (■) AcN/ácido fosfórico 50 mM, pH 3.0 (3:7, v/v). Condiciones de extracción descritas en la Tabla 16. Nivel de enriquecimiento  $1.25 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $n = 3$ ).

Las recuperaciones obtenidas (Figura 21) para ENRO, CIPRO, SARA y LOME, evaluada como posible patrón interno, empleando disolventes orgánicos puros fueron bajas en todos los casos (28 – 69 %, RSD 9 – 30 %).

En el caso de emplear MeOH, al reconstituir el extracto obtenido en la fase móvil (AcN/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, pH 3.0, 18:82, v/v), para su posterior análisis cromatográfico, se observó la aparición de un precipitado que fue necesario eliminar por filtración. Esta etapa adicional puede llevar asociada una pérdida de cantidades variables de analito(s), lo cual explicaría las bajas recuperaciones y precisión obtenidas con este disolvente. Un problema añadido al emplear este disolvente fue la aparición de 3 picos en el cromatograma correspondiente al extracto de la matriz de huevo (Figura 22.a.), atribuidos a la co-extracción de interferencias de la matriz, cuyo tiempo de retención coincide con el de 3 FQs (NOR: 8.36 min; CIPRO: 9.38 min y ENRO: 11.87 min). El efecto matriz afecta, en mayor grado, a NOR, FQ evaluada, junto con LOME, como posible patrón interno.

En el caso de emplear AcN, las recuperaciones obtenidas fueron incluso menores (28 – 44 %) que con MeOH, lo cual estaría justificado por la menor solubilidad de las FQs en este disolvente. También apareció, en este caso, un pico correspondiente a un componente co-extraído de matriz, cuyo tiempo de retención coincide con el del NOR (Figura 22.b).



**Figura 22.** Cromatogramas correspondientes a (—) un extracto de huevo control y (—) un extracto de una muestra de huevo enriquecida con  $1.25 \mu\text{g g}^{-1}$  de NOR (N), CIPRO (C), LOME (L), ENRO (E) y SARA (S), tras la extracción PLE empleando como disolvente de extracción (a) MeOH, (b) AcN, (c) MeOH /ácido fosfórico 50 mM, pH 3.0 (1:1, v/v), y (d) AcN/ácido fosfórico 50 mM, pH 3.0 (1:1, v/v). Las condiciones de extracción se recogen en la Tabla 16. Detección fluorescente:  $\lambda_{\text{exc/em}}$  280/440 nm.

Los mayores rendimientos de extracción se obtuvieron empleando las mezclas hidro-orgánicas. Las FQs presentan valores de  $\text{pK}_{\text{a}1}$  5.5-6.0 y  $\text{pK}_{\text{a}2}$  7.5-8.5, correspondientes al ácido carboxílico y al grupo amino del anillo de piperazina, respectivamente, y se encuentran en forma zwitteriónica a pH neutro (pH huevo fresco 7.6). El empleo de mezclas hidro-orgánicas a pH ácido favorece la extracción de estos antimicrobianos [237,338,548], ya que, al encontrarse en forma catiónica, aumenta su solubilidad.

Como se muestra en la Figura 22.c. el empleo de mezclas MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1:1, v/v) tampoco permitió obtener extractos suficientemente limpios, observándose la aparición de un pico cromatográfico atribuido a la elución de un componente co-extraído de matriz al mismo tiempo de retención que la CIPRO.

Las mayores recuperaciones y precisión en la extracción para el conjunto de FQs incluídas en el estudio se obtuvieron empleando una mezcla AcN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 3.0 (50:50, v/v) como disolvente de extracción, de acuerdo con lo descrito en la bibliografía por diversos autores, para otro tipo de matrices [219,220,549]. Este medio de extracción permitió obtener los extractos más limpios, dando lugar a cromatogramas con un menor número de picos interferentes procedentes de la matriz, y por consiguiente, se eligió como medio de extracción para los posteriores ensayos. Un incremento del porcentaje de fase acuosa del 50 al 70 % originó extractos más turbios, dando lugar a problemas en la manipulación de la muestra y, con ello, a una disminución de la precisión.

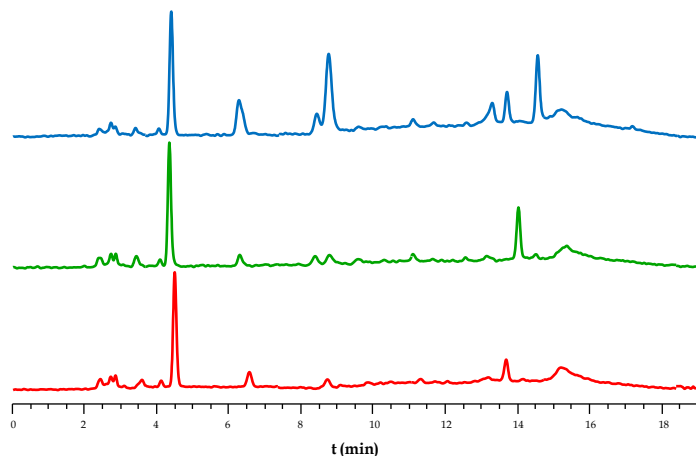
De las dos FQs evaluadas para su uso como **patrón interno** (NOR y LOME), se seleccionó **LOME** ya que, en los cromatogramas de algunos extractos de huevo, se observaron picos interferentes al tiempo de retención de NOR que interferían en su cuantificación.

La extracción PLE se aplica fundamentalmente al análisis de muestras sólidas, aunque también puede usarse con muestras semi-líquidas o con un cierto contenido en agua, como es el caso del presente estudio. En estos casos la muestra se dispersa con un material inerte, conocido como **hidromatriz**, que evita la formación de agregados, previniendo el posible bloqueo de la célula de extracción, y proporciona una gran superficie de exposición mejorando, por tanto, el contacto entre el disolvente de extracción y la matriz. Con el propósito de seleccionar el material más adecuado para esta aplicación, se evaluó el comportamiento de los dos tipos de hidromatriz más empleados en extracción PLE: la tierra de diatomeas y la arena de cuarzo [549].

Las recuperaciones obtenidas para la extracción de los antimicrobianos de muestras de huevo enriquecidas a un nivel de concentración de  $1.25 \mu\text{g g}^{-1}$ , aplicando las condiciones de extracción recogidas en la Tabla 16 y  $\text{AcN:H}_3\text{PO}_4$  50 mM, pH 3.0 (50:50, v/v) como mezcla extractante, fueron del 39 - 42 % (RSD = 3 - 13 %,  $n = 3$ ), empleando arena de cuarzo, y del 74 - 88 % (RSD = 3 - 10 %,  $n = 3$ ) utilizando tierra de diatomeas. Dado que estudios previos demostraron que las FQs no se adsorbían en ninguna de las dos hidromatrices evaluadas, las diferencias observadas se atribuyeron a la mayor capacidad de absorción de la tierra de diatomeas en comparación con la arena de cuarzo, debido a su mayor porosidad. De esta forma se mejora el contacto de la muestra con el disolvente y aumenta la eficacia de extracción, incluso empleando menor cantidad de hidromatriz (1 g de **tierra de diatomeas** por gramo de muestra, frente a los 4 g requeridos al utilizar arena de cuarzo).

Otro parámetro que afecta de forma crítica tanto al rendimiento de extracción de los analitos, como a la co-extracción de otros componentes de la matriz es la **temperatura**. El empleo de temperaturas elevadas incrementa la solubilidad de los analitos al tiempo que disminuye la tensión superficial y la viscosidad del disolvente, facilitando su interacción con la matriz. La termoestabilidad de las FQs no es un inconveniente para esta aplicación, ya que se ha demostrado que estos antimicrobianos son estables a temperaturas relativamente elevadas ( $\geq 100 \text{ }^\circ\text{C}$ ) [222]. Sin embargo, cuando se emplea ácido fosfórico en el disolvente de extracción debe evitarse la utilización de temperaturas superiores a los  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  para prevenir la oxidación de la célula de extracción [550].





**Figura 23.** Cromatogramas de extractos de huevo control en función de la temperatura de extracción: (—) 60 °C; (—) 70 °C y (—) 80 °C. Disolvente: AcN/ácido fosfórico 50 mM, pH 3.0 (50:50, v/v); presión 1500 psi, 3 ciclos (5 min).

Los valores de recuperación obtenidos oscilaron entre 69 - 83 % (RSD = 4 - 12 %; n = 3) en el intervalo de temperaturas de 60 - 80 °C, observándose un incremento notable de la turbidez de los extractos al aumentar este parámetro. Este aumento de la turbidez, atribuido a la co-extracción de componentes de la matriz, disminuye la selectividad del método (Figura 23) y dificulta el análisis directo del extracto sin una etapa previa de limpieza de muestra. Por todo ello se seleccionó una temperatura de 70 °C para posteriores análisis, como un valor de compromiso entre la eficacia de extracción de las FQs, precisión y componentes co-extraídos de la matriz.

Por último, se investigó el efecto del **tiempo de extracción** sobre la eficacia del proceso, aumentando el número de ciclos de dos a cuatro, y manteniendo una duración de 5 min por ciclo. De esta forma, el tiempo total de extracción se ve incrementado de 15 min (5 min de precalentamiento más 2 ciclos de 5 min cada uno) a 25 min (en el caso de aplicar 4 ciclos).

En general, el empleo de varios ciclos de extracción facilita la exposición de la muestra a nuevas porciones de disolvente, favoreciendo el equilibrio disolvente/muestra e incrementando la recuperación de analito. En el caso particular que nos ocupa, el número de ciclos no jugó un papel determinante en la eficacia de extracción, ya que no se encontraron diferencias significativas en los valores de recuperación obtenidos aplicando dos, tres o cuatro ciclos (70 - 78 %, RSD = 2 - 7 %, n = 4). Así, se seleccionó un total de tres ciclos de extracción (tiempo total de extracción, **20 min**) para asegurar la máxima recuperación, incluso en el análisis de

muestras de huevos contaminados, que en ocasiones pueden ser más problemáticos que las muestras enriquecidas, por las diferencias en la interacción analito-matriz.

El método optimizado se validó siguiendo los criterios descritos en la Decisión 2002/657/CE [551], en relación a las características de los métodos analíticos para la determinación de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos.

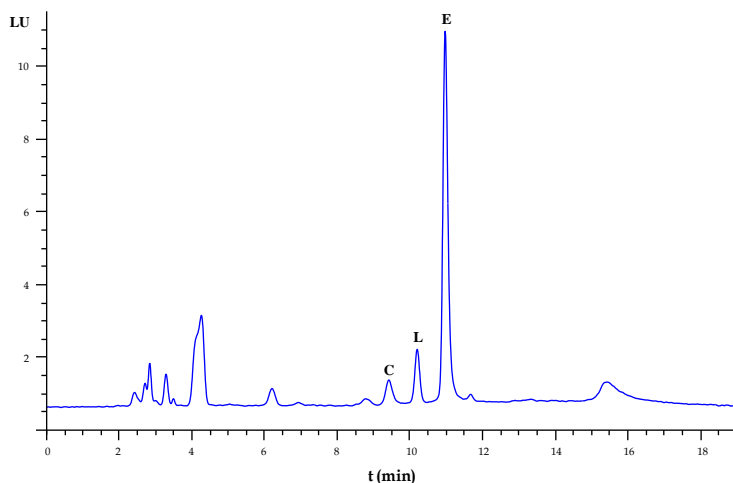
Los cromatogramas obtenidos al analizar los extractos de muestras de huevo control ( $n = 20$ ) no mostraron interferencias de la matriz a los tiempos de retención de las FQs, lo que demuestra la **especificidad** del método propuesto.

Al no disponer de un material de referencia certificado para FQs en huevo, los estudios de **exactitud** y **precisión** del método se realizaron empleando muestras enriquecidas. Se obtuvieron recuperaciones entre 66 – 89 % para las FQs estudiadas, a los niveles de concentración ensayados (50, 200 y 600 ng g<sup>-1</sup>;  $n = 4$ ), con valores de RSD inferiores al 9 % en todos los casos. Del mismo modo, la recuperación media del patrón interno (LOME, 500 ng g<sup>-1</sup>) fue de (75 ± 10) %.

La **linealidad** y la **reproducibilidad** del método analítico completo, se evaluaron enriqueciendo muestras de huevo control con concentraciones de FQs comprendidas entre 50 – 1000 ng g<sup>-1</sup>, añadiendo en todos los casos, 500 ng g<sup>-1</sup> del patrón interno (LOME). No se observaron diferencias significativas, a un nivel de confianza del 95 %, en las pendientes de los calibrados obtenidos para cada analito en días diferentes ( $n = 3$ ). Las recuperaciones obtenidas fueron del 68 – 88 % para ENRO, 67 – 90 % para CIPRO y 71 – 87 % para SARA, con valores de RSD inferiores al 11 % en todos los casos.

Por último, se calculó el **límite de decisión (CC<sub>α</sub>)** y **capacidad de detección (CC<sub>β</sub>)** para cada una de las FQs analizadas, obteniéndose valores de CC<sub>α</sub> y CC<sub>β</sub> entre 17 – 24 ng g<sup>-1</sup> y 29 – 41 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Comparando los resultados obtenidos con los publicados previamente por otros autores para este tipo de matriz, el método de extracción desarrollado permite obtener extractos más limpios, lo cual facilita su análisis directo sin una etapa previa de limpieza de muestra, obteniéndose buenas recuperaciones para todas las FQs estudiadas. Por otra parte, al tratarse de un método automático, el empleo de la extracción PLE permite reducir la manipulación de la muestra, mejorando la exactitud y precisión de los resultados analíticos obtenidos empleando otros métodos alternativos [220-222,253], con un menor coste por análisis y menor impacto ambiental.

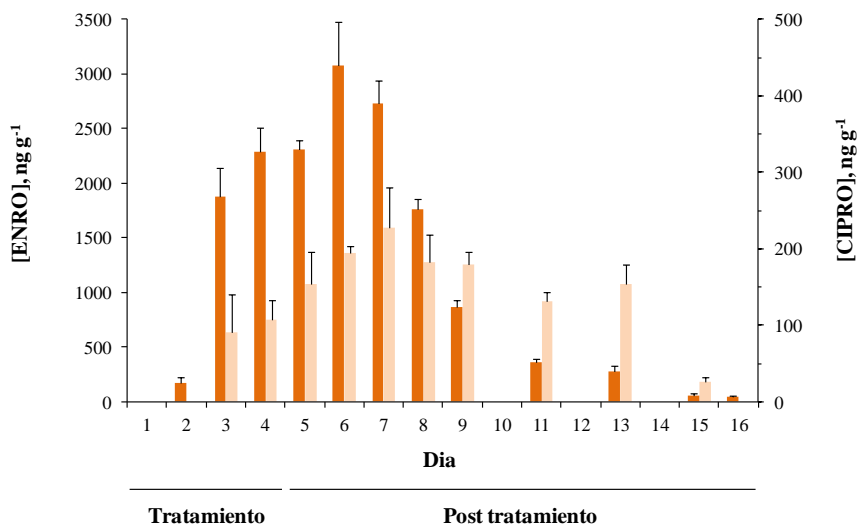


**Figura 24.** Cromatograma correspondiente a al análisis de una muestra de huevo, recogida el octavo día, tras el inicio del tratamiento. **C:** CIPRO, **L:** LOME (patrón interno, adicionado a la muestra), **E:** ENRO. Detección fluorescente:  $\lambda_{\text{exc/em}}$  280/440 nm.

Con el propósito de evaluar la aplicabilidad de la metodología desarrollada al análisis de muestras reales, se analizaron **huevos procedentes de seis gallinas ponedoras tratadas por vía oral** ( $10 \text{ mg Kg}^{-1}$ , por día) con el medicamento **Hipralona Enro S**, que contiene un 10% de ENRO como componente activo.

Las gallinas se trataron con el medicamento durante cuatro días consecutivos. Los huevos, recogidos diariamente, se clasificaron en tres lotes (dos huevos por lote) que se analizaron como tres réplicas independientes, durante 16 días consecutivos a partir del primer día de tratamiento. La aparición de residuos de ENRO y su metabolito CIPRO, se confirmó a partir de los espectros de excitación y emisión en el máximo de los picos cromatográficos registrados en el cromatograma a los tiempos de retención característicos de dichas especies. En la Figura 24 se muestra el cromatograma característico obtenido para una muestra de huevo recogida el octavo día tras el inicio del tratamiento.

Los residuos de ENRO empezaron a ser cuantificables a las 24 h de inicio del tratamiento (día 2), y alcanzaron concentraciones máximas, superiores a los  $2 \mu\text{g g}^{-1}$ , entre los días 4 – 7. La concentración máxima, superior a los  $3 \mu\text{g g}^{-1}$ , se obtuvo el sexto día tras el inicio del tratamiento, es decir, 48 h después de la última administración. Tras alcanzar dicho máximo, el contenido de ENRO presente en las muestras disminuyó rápidamente en los tres días siguientes y, más lentamente, en los días sucesivos, siendo cuantificable hasta el día 16.



**Figura 25.** Residuos de (■) ENRO y (■) CIPRO en huevos de gallinas tratadas con Hipralona EnroS (10 % ENRO) (días 1 - 4). Administración en el agua. Dosis: 1 cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>. Duración del tratamiento: 4 días.

Además de los residuos de ENRO (único antibiótico administrado), aparecieron residuos, aunque en cantidades inferiores, de su metabolito activo CIPRO, cuantificables a las 48 h del inicio del tratamiento (día 3). La concentración máxima de CIPRO, superior a los 200 ng g<sup>-1</sup>, se observó el séptimo día, aunque permaneció prácticamente constante durante todo el periodo del estudio. El contenido en CIPRO dejó de ser cuantificable el día 15. La Figura 25 muestra la evolución de la concentración de residuos de ENRO y CIPRO en los huevos analizados, en función del tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento.

En cada una de las series de análisis de muestras de huevo procedentes de gallinas tratadas con Hipralona Enro S, se incluyeron muestras control. No se observaron diferencias significativas entre la concentración de fortificación y la concentración estimada mediante el proceso de análisis descrito, hecho que supone una garantía de la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Por último, siguiendo las directrices de la Directiva 2002/657/EC, se realizaron **análisis confirmatorios**, empleando la técnica **LC-MS/MS** para la identificación inequívoca de ENRO y CIPRO en las muestras de huevos contaminadas.

En resumen, los resultados obtenidos a partir de este estudio han permitido establecer el comportamiento de eliminación de ENRO en gallinas ponedoras, lo cual

es de suma utilidad de cara a establecer LMRs para este tipo de sustancias en huevos. Por otra parte, ha sido posible determinar la curva de eliminación o depleción de residuos, necesaria para establecer los periodos de supresión o espera que deberían respetarse antes de destinar los huevos para el consumo humano.

La investigación realizada en este trabajo se publicó en la revista *Journal of Chromatography A*, 1140 (2007) 63-70 y fue merecedora, en el año 2006, del “Premio a la Investigación” que convoca anualmente el Instituto de Estudios del Huevo.

## 5.2. Desarrollo de biosensores ópticos para la determinación de contaminantes medioambientales de origen natural o antropogénico.

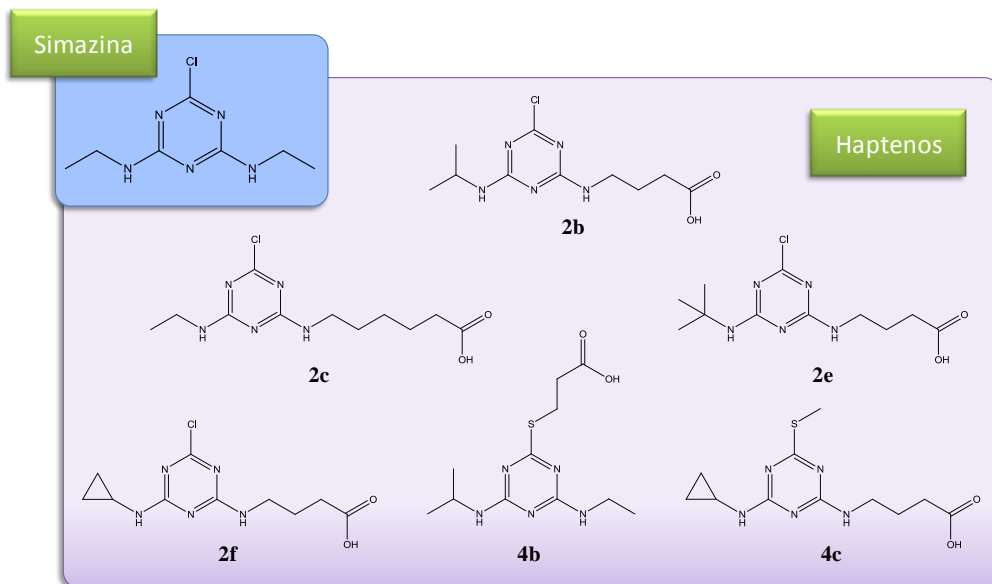
### 5.2.1. Desarrollo de un fluoroinmunoensensor para el análisis en línea de pesticidas triazínicos en aguas superficiales.

El inmunoensensor para la determinación de pesticidas triazínicos, descrito en esta Memoria, está basado en un inmunoensayo con formato competitivo, en el que el analito y una especie de estructura análoga, marcada con la enzima HRP, compiten por unirse al anticuerpo, el cual se encuentra en cantidad limitante.

Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el **Grupo de Receptores Moleculares Aplicados del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (AMRG-IQAC)**, dirigido por la Prof. M<sup>a</sup> Pilar Marco, experta en el diseño y síntesis de inmunorreactivos y su posterior aplicación al desarrollo de inmunoensayos.

La SIM, analito objeto de estudio, es una molécula de bajo peso molecular (Mw 201.66) que, por sí misma, no es capaz de inducir una respuesta inmunológica. Por ello, en el laboratorio de la Prof. Marco se **diseñaron y sintetizaron** seis haptenos (Figura 26) con una estructura química similar a la del analito, que posteriormente se emplearon en la preparación de los inmunorreactivos.

El hapeno 2c se unió covalentemente a la proteína KLH, dando lugar al **conjugado 2c-KLH**, el cual se empleó como **inmunógeno**, para la inoculación de tres conejos blancos Nueva Zelanda, obteniéndose tres **antisueros** (PABs) selectivos a simazina: **As7**, **As8** y **As9**. Adicionalmente, se llevó a cabo la síntesis de seis **trazadores enzimáticos** (ET: **2b-HRP**, **2c-HRP**, **2e-HRP**, **2f-HRP**, **4b-HRP** y **4c-HRP**), mediante la conjugación covalente de los haptenos a la enzima HRP.



**Figura 26.** Estructura química de la simazina y los haptenos sintetizados para la preparación de inmunorreactivos.

En un inmunoensayo competitivo directo es necesario conocer la afinidad de los PAb por los derivados marcados ( $\text{Ag}^*$ ) de los antígenos a determinar. Por ello, se evaluó la afeidez de cada uno de los tres PAb obtenidos por cada uno de los 6 ETs sintetizados. Este estudio se llevó a cabo mediante ensayos ELISA no competitivos, inmovilizándose una cantidad constante de PAb (100  $\mu\text{L}$ , factor de dilución entre 1000 y 64000), y midiéndose la cantidad de inmunocomplejo  $\text{Ab-Ag}^*$  formado, en presencia de una concentración constante de los ETs (50  $\mu\text{L}$ , concentración entre 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 8  $\text{ng L}^{-1}$ ).

En todos los casos, el antisuero **As8** fue el que proporcionó mayores sensibilidades. Por lo que respecta a los ETs, la respuesta obtenida fue superior en el caso del 2c-HRP, seguido del 2f-HRP y del 4e-HRP, independientemente del antisuero empleado.

Para seleccionar el par  $\text{Ab/ET}$  mas adecuado para la optimización del inmunoensayo, *i.e.* el par que permita obtener un menor valor de  $\text{IC}_{50}$ , se realizaron ensayos competitivos tipo ELISA en presencia de concentraciones crecientes de SIM, empleando las combinaciones  $\text{Ab/ET}$  que presentaron respuesta. La señal analítica más intensa en ausencia de SIM se obtuvo, de nuevo, empleando el trazador 2c-HRP. Sin embargo, los mejores resultados, en términos de sensibilidad, se consiguieron con el par  $\text{As8/2f-HRP}$ . Esto puede explicarse considerando que, tanto para la síntesis del

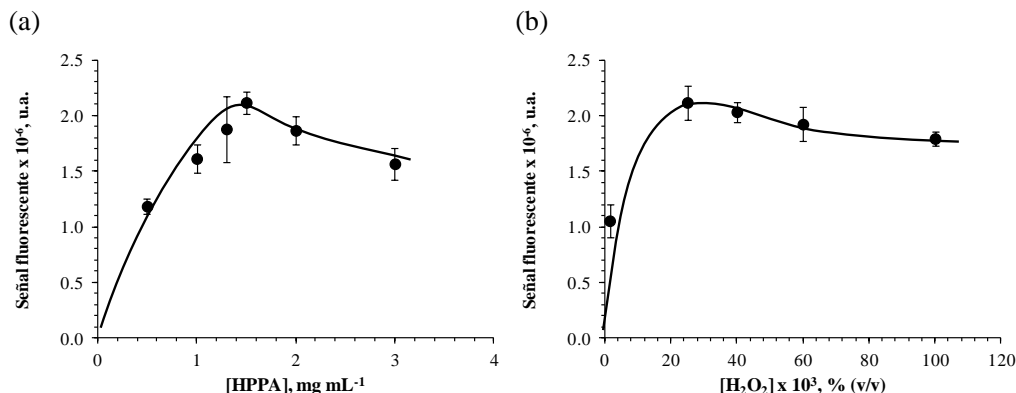
inmunógeno (2c-KLH) como del trazador (2c-HRP), se utilizó el hapteno 2c, lo que favorecería la formación del complejo Ab-Ag\* y con ello, la mayor respuesta analítica obtenida en ausencia de analito. Sin embargo, cuando se realiza un ensayo competitivo, resulta beneficioso emplear Ag\* estructuralmente diferentes del hapteno de inmunización de forma que, en presencia del analito, se favorezca el desplazamiento del equilibrio de formación del complejo Ab-Ag\* hacia la formación del complejo Ab-Ag, incrementándose la sensibilidad del ensayo. Esto se conoce como “*principio de heterología*” [552], y ha sido ampliamente descrito en bibliografía [553-556].

Por todo ello se seleccionó el **par As8/2f-HRP para el desarrollo del biosensor**, ya que esta pareja de inmunorreactivos proporcionó los mejores resultados, en términos de sensibilidad y reproducibilidad, en los ensayos ELISA.

Para facilitar la automatización de la medida se decidió optimizar y caracterizar el biosensor empleando un sistema en flujo continuo de forma que los análisis de las muestras pudiesen realizarse sin la presencia permanente de un operario. Se optimizaron los siguientes parámetros: a) naturaleza del inmunosopORTE empaquetado en el reactor; b) composición, concentración y pH de la disolución portadora; c) concentración de los inmunorreactivos (Ab y ET); d) naturaleza y concentración de los sustratos enzimáticos y, e) tiempos de incubación en cada una de las etapas del ensayo.

Como posibles **inmunosorbentes**, se ensayaron dos soportes comerciales, utilizados habitualmente en cromatografía de inmunoafinidad [557], el Ultralink® Immobilized Protein A/G Plus (PAG), y el Prosep®-A Media (CPGA). El soporte PAG está compuesto por proteína A/G inmovilizada covalentemente sobre partículas de un copolímero de bis-acrilamida/azlactona altamente entrecruzado, mientras que el soporte CPGA es de naturaleza inorgánica, y se obtiene a partir de partículas de vidrio de poro controlado sobre las que se ha unido covalentemente proteína A. Cualquiera de estos dos materiales permite la inmovilización orientada y reversible de los Ab (o conjugados Ab-Ag y/o Ab-ET) mediante una reacción de bioafinidad entre la región constante (F<sub>c</sub>) del Ab y la proteína A o A/G unida al soporte.

La respuesta analítica obtenida fue superior empleando el inmunosorbente inorgánico CPGA, atribuyéndose a la mayor capacidad de unión de IgGs que presenta este material con respecto a los otros soportes particulados (> 37 mg mL<sup>-1</sup> IgG de conejo). Además, la adsorción inespecífica del conjugado 2f-HRP también resultó menor que al emplear PAG, por lo que se decidió seleccionar el **soporte CPGA para posteriores ensayos** dado que, además, permitía obtener una excelente reproducibilidad en las medidas (RSD < 3.8 %, n = 12).

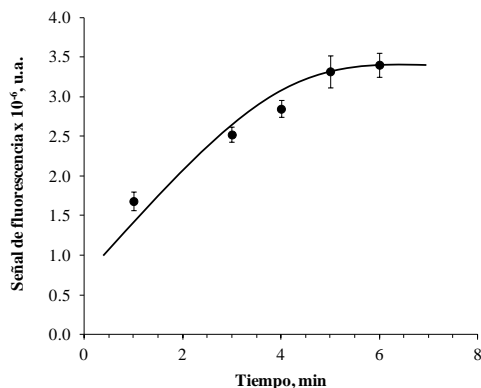


**Figura 27.** Efecto de la concentración de los sustratos enzimáticos en la respuesta del inmunosensor, en ausencia de SIM ( $B_0$ ). [2f-HRP] = 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; As8, dilución 1:2000 (v/v). (a) Efecto de la concentración de HPPA, empleando una concentración constante de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 0.025 % (v/v). (b) Efecto de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , empleando una concentración constante de HPPA de 1.5  $\text{mg mL}^{-1}$ . Disolución reguladora: PB 20 mM, pH = 8.0, (n = 3). Ensayos llevados a cabo empleando como inmunosoprote, CPGA.

Como se indicó anteriormente, en este trabajo se ha empleado como revelador un derivado de SIM marcado con la enzima HRP para el desarrollo del inmunosensor. Se evaluaron 2 **sustratos fluorogénicos** de la HRP para la optimización del ensayo: el ácido 3-*p*-hidroxifenilpropionico (HPPA) y el sustrato QuantaBlu<sup>TM</sup> NS/K (Pierce), empleando, en ambos casos, peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) como oxidante. Los resultados obtenidos en ausencia de SIM ( $B_0$ , 2f-HRP 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , As8 dilución 1:1000, v/v), demostraron que, si bien el empleo QuantaBlu<sup>TM</sup> NS/K permitía obtener mayores intensidades de fluorescencia, la respuesta era muy poco reproducible (RSD > 40 %). Por ello, se seleccionó el **HPPA como sustrato enzimático** para el desarrollo de inmunoensayo.

Seguidamente se evaluó el efecto de la **concentración de los sustratos**, HPPA y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 27) sobre la reacción enzimática. La concentración de HPPA se estudió en el intervalo de 0.5 a 3  $\text{mg mL}^{-1}$ , manteniendo constante la concentración de sustrato oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$  0.025 %, v/v). Se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia al incrementar la concentración de HPPA en la mezcla, alcanzándose una señal máxima a 1.5  $\text{mg mL}^{-1}$  (Figura 27.a). Fijando dicho valor, se estudió el efecto de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el intervalo de 0.0015 a 0.1 % (v/v), encontrándose un resultado óptimo para una concentración  $\text{H}_2\text{O}_2$  del 0.025 % (v/v) (Figura 27.b).





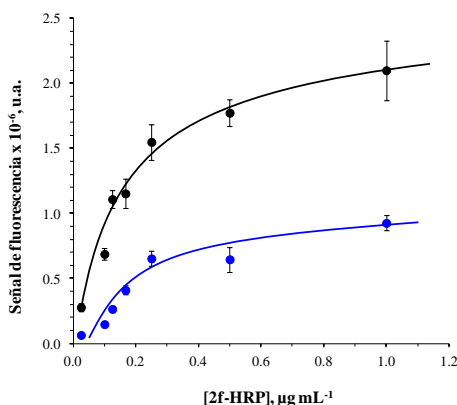
**Figura 28.** Efecto del tiempo de incubación de la mezcla HPPA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con el conjugado Ab-ET durante la reacción enzimática, en la señal de fluorescencia medida, en ausencia de SIM (B<sub>0</sub>). [2f-HRP] = 2 µg mL<sup>-1</sup>; [As8] = dilución 1:2000. Disolución portadora: PB pH 8.0; [HPPA] = 1.5 mg mL<sup>-1</sup>; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.025 % (v/v); tiempo de incubación As8 + 2f-HRP, 3 min (n = 3).

Empleando la concentración de sustratos optimizada, se evaluó el efecto del **tiempo de incubación enzima-sustrato** sobre la señal analítica. Como se muestra en la Figura 28, la intensidad de fluorescencia aumenta al hacerlo el tiempo de incubación, siendo máxima para valores  $\geq 5$  min, tiempo seleccionado para esta etapa en ensayos posteriores.

Seguidamente se optimizaron las **concentraciones de Ab y ET** empleadas en el inmunoensayo, con el fin de obtener una buena sensibilidad, así como una respuesta instrumental adecuada. Se estudió la respuesta del biosensor al variar la concentración del ET (2f-HRP) en el intervalo de concentraciones de 0.025 a 1 µg mL<sup>-1</sup>, tanto en presencia como en ausencia de SIM, empleando una concentración constante de anticuerpo (As8 dilución 1:750, v/v). Las curvas de dilución obtenidas se muestran en la Figura 29.

La respuesta del biosensor en ausencia de SIM (B<sub>0</sub>) aumenta de forma notable con la concentración de ET. No obstante, para concentraciones de 2f-HRP  $\geq 0.25$  µg mL<sup>-1</sup> el incremento en la señal analítica es mucho menor seleccionándose esta concentración para la realización del ensayo.

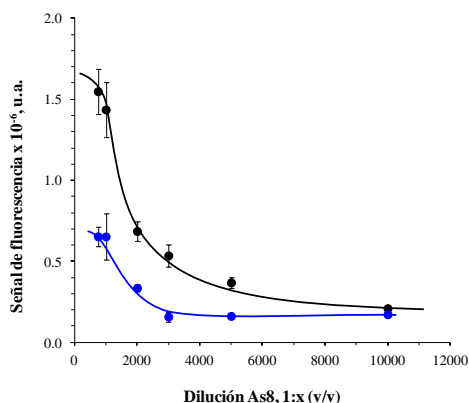
Para evaluar el efecto de la concentración de Ab, se realizaron ensayos competitivos en ausencia y en presencia de SIM, empleando diferentes diluciones del As8, comprendidas entre 1:750 y 1:10000 (Figura 30). Al disminuir la concentración de As8, disminuye la cantidad de inmunocomplejo formado, lo que se traduce en una señal analítica menor. Sin embargo, dado que el ensayo optimizado es de tipo competitivo y



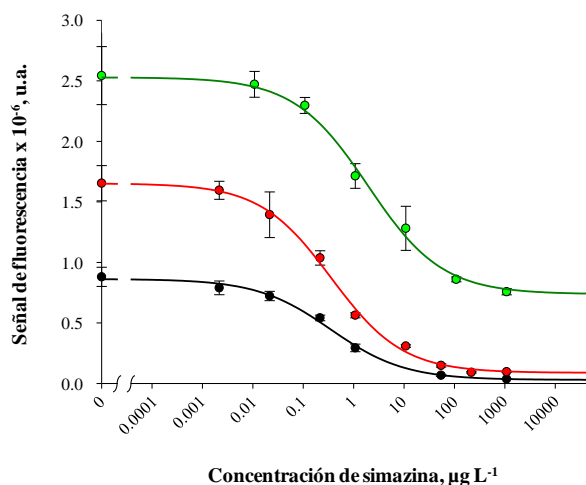
**Figura 29.** Efecto de la concentración de 2f-HRP en la respuesta del sensor, en (•) ausencia ( $B_0$ ) y (•) presencia de  $0.54 \mu\text{g L}^{-1}$  de SIM. Inmunosoporte: CPGA; disolución portadora: PB pH 8.0; [As8] = dilución 1:750, (v/v); [HPPA] =  $1.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ; [ $\text{H}_2\text{O}_2$ ] = 0.025 % (v/v); tiempo de incubación As8 + 2f-HRP, 3 min; tiempo de incubación HPPA +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 5 min ( $n = 3$ ).

el Ab debe estar en defecto, se seleccionó una dilución 1:1000 como valor óptimo para las medidas, que garantiza, además, una respuesta analítica adecuada.

Empleando una dilución 1:1000 de As8, se realizaron ensayos competitivos en presencia de concentraciones crecientes de SIM, en el intervalo de 0 a  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , para



**Figura 30.** Efecto de la concentración de antisuero, As8, sobre la respuesta del inmunosensor en (•) ausencia ( $B_0$ ) y (•) presencia de  $0.54 \mu\text{g L}^{-1}$  SIM. Inmunosoporte: CPGA; disolución portadora: PB pH 8.0; [2f-HRP] =  $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; [HPPA] =  $1.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ; [ $\text{H}_2\text{O}_2$ ] = 0.025 % (v/v); tiempo de incubación As8 + 2f-HRP + SIM, 3 min; tiempo de incubación HPPA +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 5 min ( $n = 3$ ).



**Figura 31.** Curvas de calibrado obtenidas empleando concentraciones de 2f-HRP (●) 0.17  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , (●) 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y (●) 0.50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Inmunosoprote: CPGA; disolución portadora: PB pH 8.0; [As8] = dilución 1:1000 (v/v); [HPPA] = 1.5  $\text{mg mL}^{-1}$ ; [ $\text{H}_2\text{O}_2$ ] = 0.025 % (v/v); tiempo de incubación As8 + 2f-HRP + SIM, 3 min; tiempo de incubación HPPA +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 5 min (n = 3).

tres concentraciones distintas de 2f-HRP (0.17, 0.25 y 0.50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). En la Figura 31 se muestran las curvas de calibración obtenidas para cada caso.

Los resultados demuestran que, al aumentar la concentración de ET en el intervalo de 0.17 a 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , se incrementa la señal analítica, sin afectar a la sensibilidad del ensayo (Tabla 17). Sin embargo, para una concentración de 2f-HRP de 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  disminuye la sensibilidad del ensayo aumentando tanto el límite de detección (LOD) como el valor de  $\text{IC}_{50}$ . Además, se observa un incremento en la intensidad de la señal obtenida en exceso de SIM ( $A_{\min}$ ), que puede atribuirse a la adsorción inespecífica del conjugado 2f-HRP, en exceso, sobre el inmunosoprote.

A la vista de los resultados obtenidos se seleccionó una **concentración del derivado enzimático 2f-HRP de 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y una dilución de antisero As8 1:1000 (v/v)**, para la realización del ensayo, dado que en estas condiciones se obtuvo la máxima sensibilidad ( $\text{IC}_{50} = 0.37 \mu\text{g L}^{-1}$ ), proporcionando una señal de fluorescencia adecuada y reproducible.

La **disolución portadora**, empleada en el ensayo, afecta tanto a la reacción inmunoquímica (formación de complejos Ab-Ag y Ab-Ag\*) como a la posterior inmovilización de los conjugados en el soporte. Por ello, se evaluó el efecto de su composición, concentración y pH sobre la respuesta analítica obtenida.

**Tabla 17.** Parámetros de ajuste de los datos experimentales obtenidos para diferentes concentraciones de 2f-HRP (0.17, 0.25, y 0.50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a la ecuación 3. Inmunosoprote: CPGA; disolución portadora: PB pH 8.0; [As8] = dilución 1:1000 (v/v); [HPPA] = 1.5  $\text{mg mL}^{-1}$ ; [ $\text{H}_2\text{O}_2$ ] = 25 % (v/v); tiempo de incubación Ab + Ag/ET, 3 min; tiempo de incubación HPPA +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 5 min; (n=3).

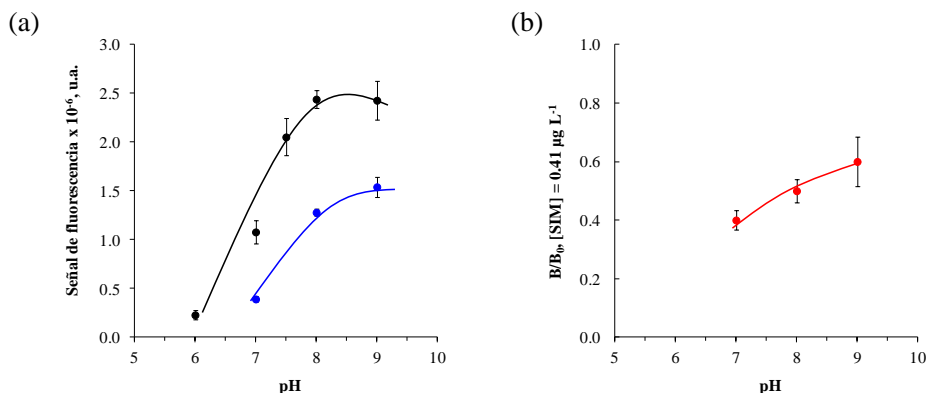
Parámetro	2f-HRP 0.17 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2f-HRP 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2f-HRP 0.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
$A_{\text{max}} \times 10^{-6}$ , u.a.	0.85	1.6	2.5
B	0.60	0.61	0.57
$A_{\text{min}} \times 10^{-6}$ , u.a.	0.025	0.080	0.71
$r^2$	0.996	0.998	0.996
Límite de detección, $\mu\text{g L}^{-1}$	0.010	0.010	0.041
$\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	0.38	0.37	2.0
Intervalo dinámico, $\mu\text{g L}^{-1}$	0.038 – 3.9	0.037 – 3.6	0.17 – 23

$A_{\text{max}}$ : asíntota máxima, b: pendiente en el punto de inflexión,  $\text{IC}_{50}$ : concentración en el punto de inflexión, en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $A_{\text{min}}$ : asíntota mínima, RSD = (2 – 14) %.

Para evaluar efecto de la composición de la disolución portadora, se midió la respuesta del biosensor, en ausencia de SIM, empleando PB (10 mM, pH 8.0), PBS (PB con un contenido en NaCl y KCl de 138 y 2.7 mM, respectivamente) y PBST (PBS con un 0.05 % de Tween20).

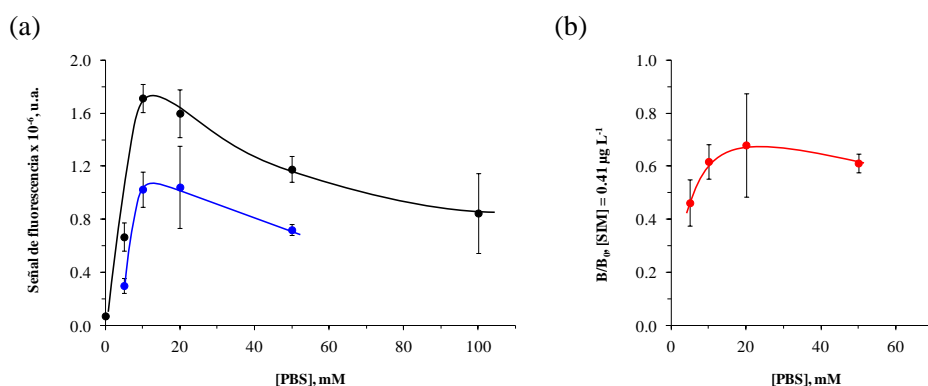
El empleo de PBS permitió obtener mayor sensibilidad y reproducibilidad que cuando se usó PB como disolución portadora. Se ha descrito que, cuando las interacciones químicas entre Ag y Ab son predominantemente de naturaleza no electrostática, la presencia de cationes de radio iónico pequeño, como los iones  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  presentes en el PBS, pueden aumentar la afinidad de los Ab por los analitos, al disminuir la distancia entre el epítipo y paratopo, lo que facilita la formación de enlaces de van der Waals y la estabilización de los inmunocomplejos [558,559].

Si bien el incremento de la fuerza iónica mejoró la respuesta del inmunosensor, la presencia del surfactante Tween20 afectó negativamente a la reproducibilidad del ensayo, debido a la formación de espumas y burbujas de aire en el sistema de medida. Por ello, se seleccionó el PBS como disolución reguladora.

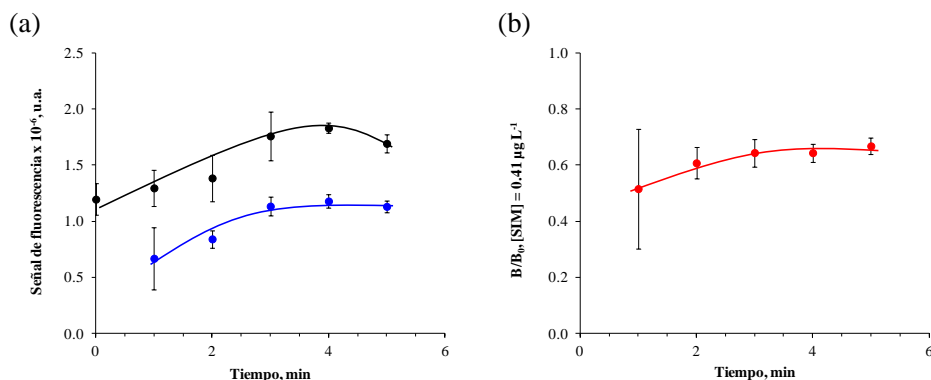


**Figura 32.** Efecto del pH en la respuesta del inmunosensor. (a) Señal de fluorescencia media en (•) ausencia ( $B_0$ ) y (•) presencia de  $0.41 \mu\text{g L}^{-1}$  de SIM (B). (b) Sensibilidad de la respuesta ( $B/B_0$ ) en presencia de  $0.41 \mu\text{g L}^{-1}$  de SIM. Disolución portadora: PBS 10 mM; [2f-HRP] = 250 ng mL<sup>-1</sup>; [As8] = dilución 1:1000 (v/v); [HPPA] = 1.5 mg mL<sup>-1</sup>; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.025 % (v/v); tiempos de incubación de la reacción inmunoquímica y reacción enzimática, 3 min (n = 3).

El efecto del pH sobre la respuesta del biosensor se evaluó en el intervalo entre 6.0 y 9.0 (Figura 32), tanto en ausencia como en presencia de SIM ( $0.41 \mu\text{g L}^{-1}$ ). No se ha observado un efecto muy pronunciado en la sensibilidad del ensayo ( $B/B_0$ ); sin embargo, la máxima señal de fluorescencia obtenida en ausencia de analito y la mayor reproducibilidad en las medidas se registró a pH 8.0, seleccionándose este valor para ensayos posteriores.



**Figura 33.** Efecto de la concentración de PBS en la respuesta del inmunosensor. (a) Señal de fluorescencia medida (•) en ausencia ( $B_0$ ) y (•) en presencia de  $0.41 \mu\text{g L}^{-1}$  de SIM (B). (b) Sensibilidad de la respuesta ( $B/B_0$ ) en presencia de  $0.41 \mu\text{g L}^{-1}$  de SIM. Disolución portadora: PBS pH 8.0; [2f-HRP] = 250 ng mL<sup>-1</sup>; As8 = dilución 1:1000; [HPPA] = 1.5 mg mL<sup>-1</sup>; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.025 % (v/v); (n = 3).



**Figura 34.** (a) Efecto del tiempo de incubación de la mezcla As8/2f-HRP en (•) ausencia ( $B_0$ ) y (•) presencia de  $0.41 \mu\text{g L}^{-1}$  de SIM. (b) Sensibilidad de la respuesta ( $B/B_0$ ) en presencia de  $0.41 \mu\text{g L}^{-1}$  de SIM. Disolución portadora: PBS pH 8.0; [As8] = dilución 1:1000 (v/v); [2f-HRP] =  $250 \text{ ng mL}^{-1}$ ; [HPPA] =  $1.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ; [ $\text{H}_2\text{O}_2$ ] = 0.025 % (v/v); tiempo de incubación enzimática, 5 min (n = 3).

Finalmente, el efecto de la concentración del PBS (pH 8.0) en la respuesta del inmunosensor se evaluó en el intervalo de 0 a 100 mM (Figura 33).

Un aumento de la concentración de tampón en el intervalo de 5 a 50 mM, no influyó significativamente en la sensibilidad del ensayo ( $B/B_0$ , Figura 33.b). Sin embargo, se observó un incremento significativo de la intensidad de fluorescencia obtenida en ausencia del analito al incrementar la concentración del tampón, alcanzándose una señal máxima para un valor 10 mM.

Por todo ello se decidió utilizar un **tampón fosfato salino (PBS) 10 mM, a pH 8.0** como disolución reguladora para el desarrollo del biosensor.

El tiempo de incubación necesario para que se produzca la reacción de competición, entre Ag y Ag\*, por los sitios de unión del anticuerpo, puede tener un efecto directo sobre la sensibilidad del inmunoensayo [138,561,562]. Por tanto, se evaluó el efecto del **tiempo de reacción inmunoquímica**, o incubación entre Ag, ET y Ab en el intervalo de 0 a 5 min. Como se muestra en la Figura 34, no se observaron diferencias significativas en la respuesta del biosensor, en ausencia de analito ( $B_0$ ), para tiempos de incubación  $\geq 3$  min. Sin embargo, la reproducibilidad de las medidas mejoró notablemente para tiempos de incubación superiores a 3 min, sin verse afectada la sensibilidad del ensayo ( $B/B_0$ ). Por todo ello se seleccionó un tiempo de incubación de **4 min**, como valor óptimo para la realización de las determinaciones posteriores, como compromiso entre la intensidad de respuesta, la reproducibilidad de las medidas y el tiempo total de análisis.

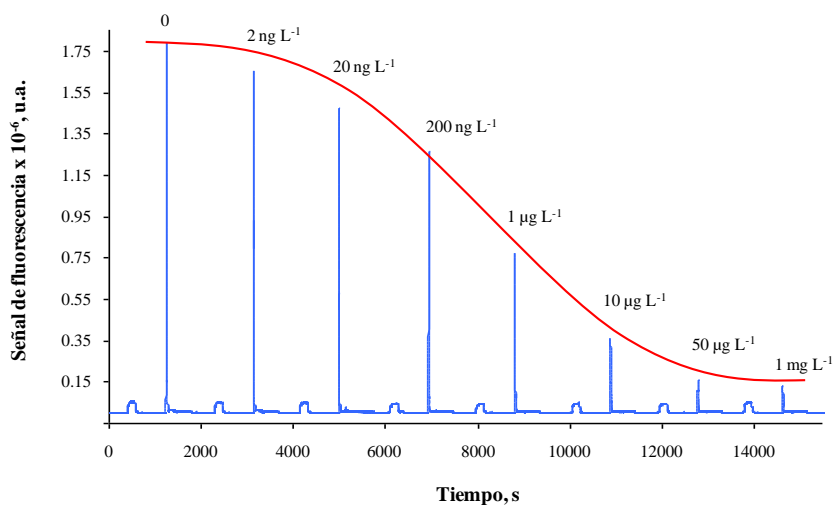
En la Tabla 18 se resumen las condiciones óptimas para la medida de SIM con el fluoroinmunosensor desarrollado en la presente Tesis.

Seguidamente, empleando las condiciones de medida recogidas en la Tabla 18, se procedió a la caracterización analítica del inmunosensor óptico para la determinación de SIM en aguas. En la Figura 35 se muestran los perfiles de respuesta obtenidos con el biosensor para la medida secuencial de muestras de agua tamponada, enriquecidas con concentraciones crecientes de SIM, en el intervalo de 0 a 1 mg L<sup>-1</sup>.

La respuesta del biosensor es muy reproducible en el intervalo de concentraciones estudiado. En la Figura 36 se muestra la curva de calibrado obtenida en un ensayo ELISA y con el fluoroinmunosensor, empleando el par de inmunorreactivos As8/2f-HRP. Como puede apreciarse, el biosensor desarrollado permite no solo la automatización de las medidas, sino que mejora las características del método ELISA, disminuyendo el límite de detección y ampliando el intervalo dinámico de respuesta al analito.

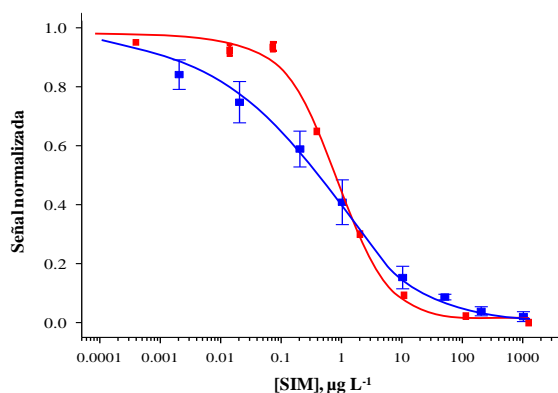
**Tabla 18.** Condiciones experimentales optimizadas del sistema de análisis por inyección en flujo, para la determinación de SIM, empleando un inmunoensayo basado en la pareja de inmunorreactivos As8/2f-HRP.

Variables experimentales	Intervalo ensayado	Valor optimizado
Tiempo de incubación (As8 + SIM/2f-HRP), min	0 – 5	4
Factor de dilución de As8 (1:x, v/v)	750 – 10000	1000
Concentración de 2f-HRP, µg mL <sup>-1</sup>	0.025 – 1	0.25
Disolución portadora	PB PBS PBST	PB 10 mM, pH 8.0
Concentración de HPPA, mg mL <sup>-1</sup>	0.5 – 3.0	1.5
Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , % (v/v)	0.0015 – 0.1	0.025
Tiempo de incubación HPPA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , min	1 – 6	5
Medio de regeneración	--	Glicina/HCl ( 0.1 M, pH 2.0)
Inmunoadsorbente	PAG CPGA	CPGA
Tiempo total de análisis por muestra, min	--	30



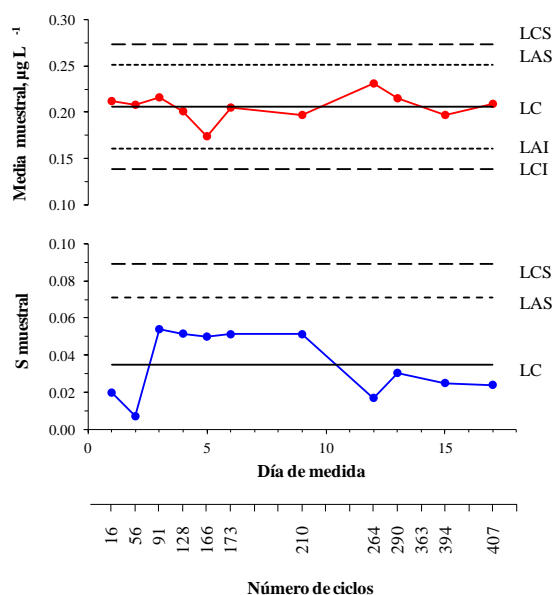
**Figura 35.** Perfil de respuesta obtenido con el inmunosensor al llevar a cabo el análisis secuencial de muestras de SIM patrón, con concentraciones comprendidas entre 0 y 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Condiciones experimentales indicadas en la Tabla 18.

El biosensor desarrollado presenta un LOD de  $1.3 \pm 0.9 \text{ ng L}^{-1}$ , un valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $0.35 \pm 0.04 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , y un intervalo dinámico comprendido entre 0.010 y  $7.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Figura 36.** Curva de calibración obtenida empleando los inmunorreactivos As8/2f-HRP en dos formatos de ensayo: (■) ensayo ELISA (las barras de error corresponden a la desviación estándar para la medida de 1 calibrado,  $n = 3$ ) e, (■) inmunoensayo en flujo (las barras de error corresponden a la desviación estándar para la media de 5 calibrados y 3 réplicas por calibrado,  $n = 15$ ).





**Figura 37.** Gráfico de control (Shewhart) construido para la respuesta del inmunoensayo en flujo frente a una disolución patrón de SIM  $0.205 \mu\text{g L}^{-1}$ , ( $n = 3$ ). LC, línea central ( $\bar{x}$ ); LAS, línea de aviso superior ( $\bar{x} + 2s/\sqrt{n}$ ); LAI, línea de aviso inferior ( $\bar{x} - 2s/\sqrt{n}$ ); LCS, línea de control superior ( $\bar{x} + 3s/\sqrt{n}$ ); LCI, línea de control inferior ( $\bar{x} - 3s/\sqrt{n}$ ).

La precisión del inmunosensor se ha estimado en términos de **repetibilidad** y **reproducibilidad** de los resultados. Con este fin se evaluó la repetibilidad del inmunosensor analizando muestras patrón, a distintos niveles de concentración de SIM, obteniéndose valores de RSD inferiores al 10% ( $n = 4$ ), para todas las muestras analizadas. Para evaluar la reproducibilidad del biosensor, se midieron 5 calibrados, para concentraciones de SIM en el intervalo de 0 a  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , en días alternos. Los resultados obtenidos ( $\text{RSD} < 15\%$ ,  $n = 5$ ) son comparables a los que aparecen descritos en bibliografía para inmunoensayos basados en el mismo principio de medida, en los que las desviaciones típicas suelen estar comprendidas entre el 10 y el 25% [563,564].

El inmunosoprote empleado en los ensayos puede regenerarse, empleando una disolución Gly/HCl ( $0.1 \text{ M}$  pH 2.0). Como se observa en la Figura 37, la respuesta analítica permanece constante durante las sucesivas etapas de regeneración, al menos 400 ciclos consecutivos, en el periodo de tiempo estudiado, lo que pone de manifiesto la extraordinaria capacidad de inmovilización/desorción de inmunocomplejos que presenta el soporte seleccionado.

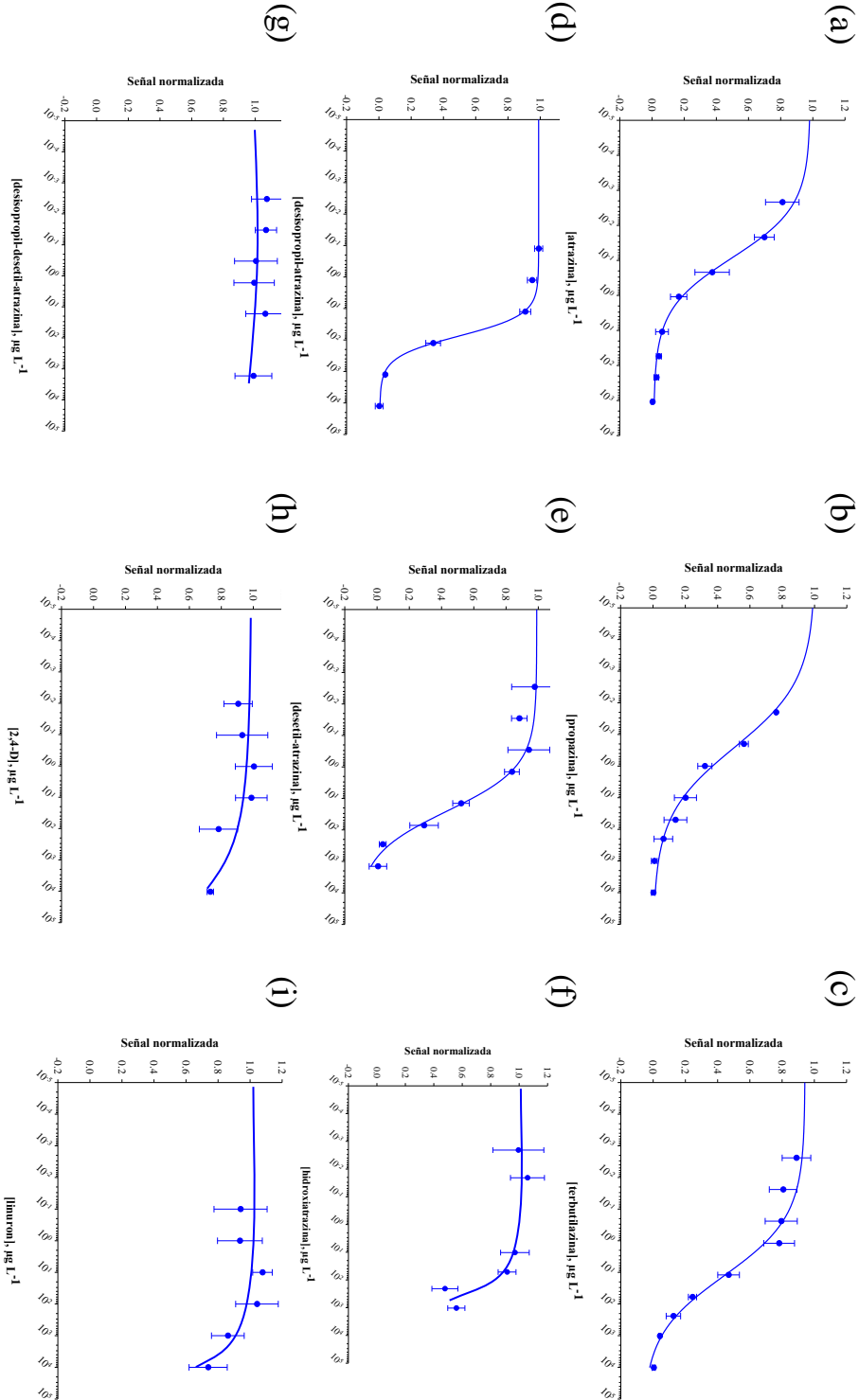
**Tabla 19.** Reactividad cruzada relativa a SIM obtenida con el inmunoensayo competitivo desarrollado para distintos pesticidas.

Analito	IC <sub>50</sub> , µg L <sup>-1</sup>	CR (%)
Simazina	0.35	100
Atrazina	0.09	420
Propazina	0.29	130
Terbutilazina	5.93	6
Desisopropil-atrazina	74.85	0.5
Desetil-atrazina	17.27	2
Hidroxiatrazina	> 90.00	< 0.4
Desisopropil-desetil-atrazina	> 10000	< 0.003
2,4-D	> 10000	< 0.003
Linuron	> 10000	< 0.003

Se ha evaluado la **reactividad cruzada** (CR) que presenta el antisuero As8 empleado en el desarrollo del biosensor, comparando las curvas de calibrado obtenidas para el analito diana (SIM), con las correspondientes tanto a distintos productos de degradación de la SIM (desisopropil-atrazina, desisopropil-desetil-atrazina) como a otros compuestos triazínicos (ATR, propazina, terbutilazina, desetil-atrazina e hidroxiatrazina).

Adicionalmente, se evaluó la reactividad cruzada del inmunosensor frente a pesticidas de distintas familias, que podrían encontrarse junto a las TRZs en las muestras a analizar (i.e. 2,4-D y linuron), (Figura 38 y Tabla 19).

El antisuero As8 seleccionado muestra especificidad de grupo, presentando una reactividad cruzada importante para s-TRZs, tales como ATR (420%) y propazina (130%) (Figuras 38.a y b, respectivamente), compuestos con una estructura molecular similar al hapteno 2c utilizado para la síntesis del inmunógeno y en la producción del antisuero. Sorprendentemente, el reconocimiento es mucho menor en el caso de la desisopropil-atrazina (DIA, CR 0.5%) o la desetil-atrazina (DEA, CR 2%), y no se observa competición para la desisopropil-desetil-atrazina, en el intervalo de concentraciones estudiado (0 – 1 mg L<sup>-1</sup>). Este menor reconocimiento podría atribuirse a la presencia de un grupo amino libre que puede interferir en la formación del



**Figura 38.** Curva de calibrado normalizada correspondiente al inmunoensayo competitivo para la determinación de (a) atrazina; (b)

inmunocomplejo Ag-Ab. Por otra parte, la baja reactividad cruzada observada con la hidroxilatrazina (< 0.4%) puede explicarse considerando que carece del átomo de cloro en posición 6 de la estructura triazínica, que parece ser esencial para el reconocimiento por parte del anticuerpo.

Cabe destacar que los compuestos no triazínicos evaluados (2,4-D y linuron) no presentan CR en el intervalo de concentraciones estudiado (0 - 1 mg L<sup>-1</sup>).

Por tanto, el inmunosensor desarrollado presenta una elevada especificidad de grupo y puede aplicarse como método de barrido para el análisis multiresiduo de los pesticidas pertenecientes a la familia de las s-TRZs más empleados (SIM y ATR), a los niveles de concentración establecidos por la Unión Europea para el agua potable (0.1 µg L<sup>-1</sup>).

Antes de proceder a la aplicación directa del biosensor al análisis de aguas superficiales, se calibró su respuesta en muestras de agua de río y de embalse, libres de triazinas, a un nivel de concentración inferior al LOD del método, para evaluar la existencia de efecto matriz. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los casos con los calibrados obtenidos en PBS, por tanto se puede concluir que el inmunosensor en flujo permite el análisis directo de SIM en muestras de agua superficial, empleando un calibrado externo en PBS. El LOD obtenido para la determinación de SIM en aguas ( $1.3 \pm 0.9$  ng L<sup>-1</sup>) resultó comparable [565], e incluso menor [138,536,566,567], que el de otros biosensores o inmunoensayos enzimáticos descritos en la bibliografía, selectivos a dicho analito.

El inmunosensor desarrollado se aplicó a la determinación de SIM en muestras ciegas de agua de río y embalse, enriquecidas previamente con dicho pesticida a distintos niveles de concentración. Para validar el método, las muestras de agua se analizaron, en paralelo, empleando métodos cromatográficos SPE/HPLC-DAD y SPE/GC-NPD. No se observaron diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% entre los resultados obtenidos por los distintos métodos, lo que demuestra la aplicabilidad práctica del inmunosensor optimizado, para la realización de este tipo de análisis, siendo una excelente alternativa a los ensayos de barrido descritos en bibliografía para la determinación de s-triazinas en muestras medioambientales.

La investigación realizada en este trabajo se publicó en la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (2008) 1801-1812.

### **5.2.2. Desarrollo de biosensores ópticos para la determinación de microcistinas en aguas.**

#### **5.2.2.1. Desarrollo de un biosensor basado en SPR para la detección de microcistinas en agua potable.**

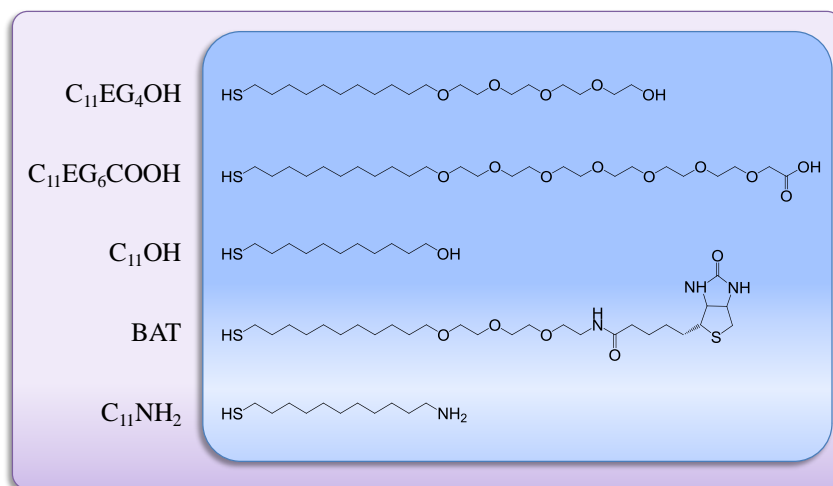
El trabajo recogido en este capítulo se ha centrado en el desarrollo de un inmunosensor, basado en medidas de SPR, para la detección de microcistinas (MCs) en agua potable.

Uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de un biosensor es la inmovilización del elemento de reconocimiento biológico sobre la superficie del transductor. Cualquiera que sea el método de inmovilización utilizado, hay una serie de factores que deberán tenerse en cuenta a la hora de elegir el procedimiento más adecuado para la preparación del biosensor. Entre otros podemos destacar: a) la preparación de una capa de receptor, con una densidad superficial óptima, que permita evitar o minimizar la unión inespecífica de otras especies; b) que se preserve la actividad biológica del elemento inmovilizado así como su estabilidad durante la vida útil del biosensor, tanto en condiciones de medida como de almacenamiento y; c) el proceso de inmovilización deberá ser fácil de aplicar y reproducible para facilitar la producción en serie.

En el caso de los biosensores basados en SPR, los procedimientos más importantes empleados para la inmovilización de biomoléculas sobre la superficie de oro del chip se basan en adsorción física o atrapamiento, unión covalente o captura mediante interacciones de alta afinidad. Todos ellos se han evaluado en el presente trabajo para inmovilizar, sobre la superficie del chip, los anticuerpos selectivos a MCs (Ab anti-MCs) o, alternativamente, la toxina, MCLR, o los haptenos correspondientes.

Para inmovilizar las biomoléculas por *vía* covalente o mediante interacciones de alta afinidad (avidina-biotina) fue necesario funcionalizar, previamente, la superficie sensora, empleando monocapas autoensambladas (SAM) de tioles. Estas capas son fáciles y reproducibles de obtener y presentan gran flexibilidad para la inmovilización de biomoléculas. La formación de una SAM proporciona una monocapa uniforme y compacta que permite reducir las interacciones no específicas y favorece la inmovilización de las moléculas con una densidad y orientación controlada. La Figura 39 muestra la estructura de los tioles empleados en las distintas funcionalizaciones.

Cuando se emplean biosensores basados en SPR, la selección del formato de ensayo de ensayo depende de varios factores incluidos, el tamaño del analito a detectar, las



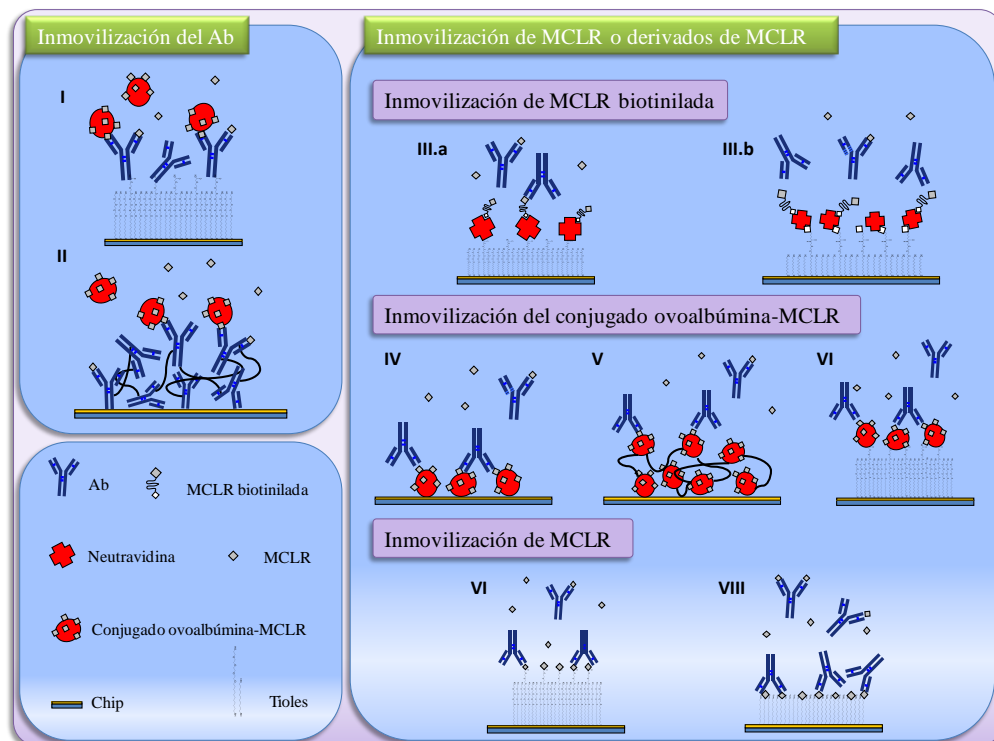
**Figura 39.** Estructura molecular de los tioles empleados para la formación de SAM sobre la superficie del chip de oro.

características de su interacción con el elemento de reconocimiento, el intervalo de concentraciones a analizar o, la matriz de la muestra. En el presente trabajo, dado que el tamaño de la MCLR (Mw 995.2) es inferior a 10 kDa, se evaluaron dos formatos de ensayo alternativos: a) ensayo competitivo con detección directa, inmovilizando el Ab sobre la superficie del oro y; b) ensayo competitivo con detección indirecta, también llamado ensayo de inhibición, basado en la inmovilización de la toxina, o un derivado de la misma sobre el chip de SPR.

Los formatos de ensayo empleados en cada caso se resumen a continuación (Figura 40):

✓ **Formatos de ensayo competitivo con detección directa, basados en la inmovilización del Ab anti-MCs.** El Ab se inmovilizó sobre la superficie empleando dos aproximaciones distintas: a) covalentemente, a través de los grupos carboxilo de la superficie del chip SPR, previamente modificado con una SAM compuesta por  $C_{11}EG_4OH$ :  $C_{11}EG_6COOH$  (7:3, v/v) (*fase sensora I*); y b) por entrecruzamiento con glutaraldehído (GA) (*fase sensora II*).

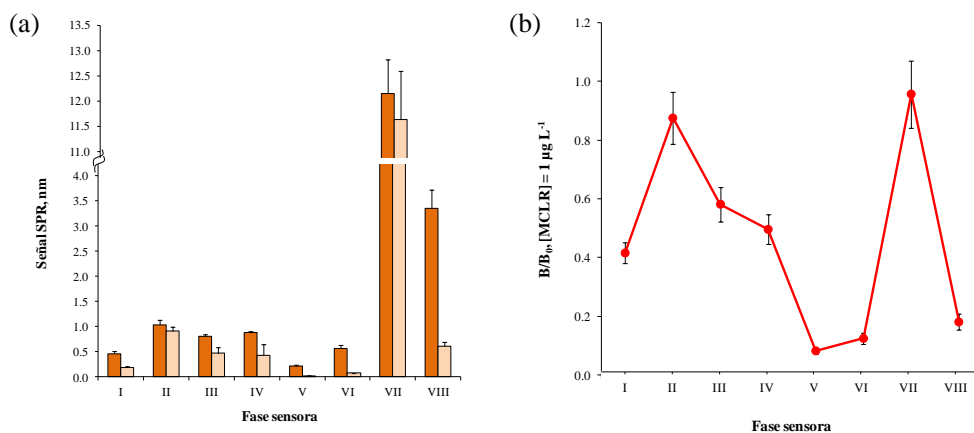
✓ **Formatos de ensayo competitivo con detección indirecta basados en la inmovilización de MCLR biotinilada.** La MCLR biotinilada se inmovilizó, mediante interacciones de alta afinidad (neutravidina-biotina), empleando chips SPR previamente recubiertos con neutravidina (*fase sensora III*). Para la inmovilización de la proteína se evaluaron dos aproximaciones: a) unión covalente, empleando chips SPR



**Figura 40.** Formatos de ensayo evaluados para el desarrollo del biosensor SPR selectivo a MC. (A) **Ensayo competitivo con detección directa** basado en: **I.** Inmovilización covalente del Ab anti-MCs sobre una superficie modificada con una SAM con grupos carboxilo; **II.** Inmovilización del Ab anti-MCs por entrecruzamiento con GA; (B) **Ensayo competitivo con detección directa** basado en: **III.** Inmovilización de MCLR biotinilada sobre chips modificados previamente con neutravidina, mediante enlace covalente (III.a), o no covalente (III.b); **IV.** Adsorción física del conjugado ovoalbúmina-MCLR; **V.** Inmovilización del conjugado ovoalbúmina-MCLR por entrecruzamiento con GA; **VI.** Inmovilización covalente del conjugado ovoalbúmina-MCLR sobre una superficie modificada con una SAM con grupos carboxilo; **VII.** Inmovilización covalente de MCLR a través del grupo amino terminal presente en su estructura; **VIII.** Inmovilización covalente de MCLR a través de los grupos carboxilo presentes en su estructura.

previamente modificados con una SAM compuesta por  $C_{11}EG_4OH$ :  $C_{11}EG_6COOH$  (7:3, v/v) (*fase sensora III.a*); y b) mediante unión no covalente, sobre chips SPR modificados con una SAM obtenida a partir de  $C_{11}OH$ :BAT (9:1, v/v) (*fase sensora III.b*).

✓ **Formatos de ensayo competitivo con detección indirecta basados en la inmovilización del conjugado ovoalbúmina-MCLR.** El conjugado ovoalbúmina-MCLR se inmovilizó empleando tres aproximaciones distintas: a) mediante adsorción



**Figura 41.** a) Señales SPR obtenidas con los biosensores preparados empleando los formatos de inmovilización descritos en la Figura 40, en (■) ausencia y (□) presencia  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de MCLR. b) Sensibilidad de la respuesta ( $B/B_0$ ) en presencia de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de MCLR.

física sobre el chip de oro (*fase sensora IV*); b) por entrecruzamiento con GA (*fase sensora V*); y c) mediante enlace covalente, sobre la superficie de oro previamente modificada con una SAM compuesta por  $\text{C}_{11}\text{EG}_4\text{OH}:\text{C}_{11}\text{EG}_6\text{COOH}$  (7:3, v/v) (*fase sensora VI*).

✓ **Formatos de ensayo competitivo con detección indirecta basados en la inmovilización de MCLR.** La toxina se unió covalentemente a la superficie del chip a través de: a) el grupo amino terminal (residuo arginina) (*fase sensora VII*); o b) los restos ácido carboxílico de su estructura (*fase sensora VIII*). Para ello, los chips SPR se funcionalizaron, previamente, con una SAM compuesta por  $\text{C}_{11}\text{EG}_4\text{OH}:\text{C}_{11}\text{EG}_6\text{COOH}$  (7:3, v/v) o  $\text{C}_{11}\text{NH}_2$ , respectivamente.

La Figura 41 muestra un resumen de la respuesta SPR obtenida empleando cada una de las fases sensoras evaluadas para una disolución estándar de MCLR de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , en PBS.

Como se indicó anteriormente, la MCLR es una toxina de bajo peso molecular ( $M_w$  995.2), por lo que no fue posible determinarla mediante un ensayo directo empleando las **fases sensoras I y II**, resultantes de la inmovilización del Ab (datos no mostrados). Esto se debe a que la variación producida en el índice de refracción del medio adyacente a la superficie metálica, como consecuencia de la interacción Ab-MCLR, es pequeña lo que origina una baja sensibilidad al analito y el intervalo de trabajo quedaría limitado a concentraciones elevadas.



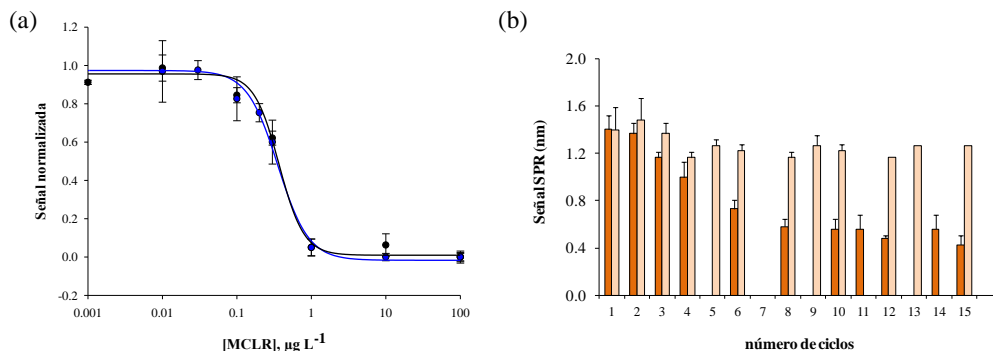
Para evitar este problema la detección se llevó a cabo empleando un ensayo competitivo, en presencia de un derivado del analito de alto peso molecular, el conjugado ovoalbúmina-MCLR ( $\text{Ag}^*$ ), que compite con el analito por la unión al receptor inmovilizado en la superficie. En este caso la señal será inversamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra y, como se muestra en la Figura 41, aunque se observó un incremento en la sensibilidad del sensor en relación a la obtenida en el ensayo directo, la sensibilidad del dispositivo era muy inferior a la requerida para el análisis de muestras de agua potable por lo que se decidió descartar este formato de ensayo.

Se procedió así a evaluar los resultados obtenidos empleando un formato de inhibición funcionalizando la superficie de oro con MCLR, MCLR biotinilada o el conjugado OVA-MCLR. En este formato, la toxina presente en la muestra compite con la MCLR inmovilizada en la superficie, por unirse al anticuerpo, el cual se encuentra en cantidad limitante. Al igual que en el caso anterior, la respuesta SPR disminuye al aumentar la concentración de analito en la muestra.

Aunque la mayor respuesta ( $B_0$ ) se obtuvo empleando la **superficie VII**, la sensibilidad obtenida con este inmunosensor fue la menor de todas las evaluadas, lo que se atribuyó a la adsorción inespecífica del Ab sobre la superficie del chip. Para confirmar este dato se evaluó la respuesta de una superficie control, preparada en ausencia de MCLR, durante la etapa de funcionalización. Para prevenir este problema, se incluyó en el protocolo de medida una etapa de bloqueo adicionando al tampón de ensayo un agente bloqueante comercial, Superblock® T20. No obstante, tampoco en estas condiciones se observaron diferencias significativas entre la respuesta obtenida con la superficie de control o el sensor SPR, tanto en ausencia ( $B_0$ ) como en presencia de MCLR (B). El empleo de las **fase sensoras III.a y III.b**, tampoco supuso una mejora significativa de la sensibilidad del sensor a la toxina, tanto en ausencia como en presencia de una etapa de bloqueo, previa a la medida de la muestra.

Los mejores resultados, en términos de sensibilidad ( $B/B_0$  Figura 41.b), se obtuvieron empleando las **fases sensoras V, VI y VIII**, *i.e.* inmovilizando covalentemente el conjugado ovoalbúmina-MCLR, entrecruzándolo con GA o, uniendo covalentemente la toxina a través de los grupos carboxilo de su estructura, respectivamente.

Las fases sensoras basadas en la inmovilización del conjugado OVA-MCLR (formatos V y VI) presentaron señales SPR bajas. Se realizaron varios experimentos para estudiar el efecto de la concentración del conjugado OVA-MCLR, durante la etapa de funcionalización del chip, en el intervalo de 25 a 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , observándose



**Figura 42.** Influencia del procedimiento de funcionalización de la superficie de oro sobre la respuesta del sensor. (a) Curva de calibración obtenida inmovilizando la MCLR mediante un proceso (•) dinámico (30 min, 30  $\mu\text{L min}^{-1}$ ) o (•) estático (16 h, 4  $^{\circ}\text{C}$ ). (b) Estabilidad de la respuesta del chip preparado mediante funcionalización (■) dinámica y (■) estática, en ausencia de MCLR ( $B_0$ ). Funcionalización: [MCLR] = 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , [EDC] = 80 mM, [NHS] = 20 mM en PBS. Condiciones de ensayo: concentración de Ab anti-MC (MC10E7), 0.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; tiempo de reacción inmunológica, 20 min; regeneración, NaOH 50mM ( $n = 3$ ).

señales SPR similares en todos los casos. La baja intensidad de respuesta obtenida al emplear el conjugado ovoalbúmina-MCLR como receptor inmovilizado podría deberse al bajo grado de conjugación, *i.e.* al bajo número de moléculas de MCLR unidas por molécula de proteína (dato solicitado pero no suministrado por el fabricante), o a la orientación, no controlada, del conjugado durante su inmovilización. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se seleccionó **como fase sensora** para el desarrollo del inmunosensor, la **superficie VIII**, dado que presentaba una buena sensibilidad a la toxina, originando una señal SPR significativamente mayor en ausencia de MCLR ( $B_0$ ).

Tras seleccionar el formato de ensayo, se evaluaron dos procedimientos para la **inmovilización covalente** de la MCLR sobre la superficie metálica: 1) inmovilización *dinámica o en flujo*, con el chip de oro alojado en el equipo de medida, fluyendo sobre la superficie del chip, una disolución de MCLR (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 80 mM EDC mM y 20 mM NHS en PBS; 30 min, 30  $\mu\text{L min}^{-1}$ ) y, 2) inmovilización *estática*, depositando 330  $\mu\text{L}$  de la disolución anterior sobre la superficie del chip, e incubando durante 16 h, a 4 $^{\circ}\text{C}$ .

El comportamiento de los chips se evaluó empleando disoluciones patrón de MCLR, con concentraciones en el intervalo de 0 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $[\text{Ab}] = 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). En ambos casos se obtuvieron resultados similares en términos de sensibilidad e intervalo dinámico (Figura 42.a). No obstante, la inmovilización en estático permitió obtener superficies significativamente más estables, manteniéndose el 95 % de la respuesta inicial durante, al menos, 15 ciclos sucesivos de ensayo-regeneración (Figura 42.b). Por

el contrario, cuando la inmovilización se llevó a cabo en flujo, se observó una disminución de la señal analítica tras los primeros ciclos de medida, que se estabilizó tras 8 – 10 ciclos. Estos resultados parecen sugerir que parte de la MCLR no estaba inmovilizada covalentemente sobre la superficie metálica, sino adsorbida físicamente, eliminándose tras los primeros los primeros ensayos.

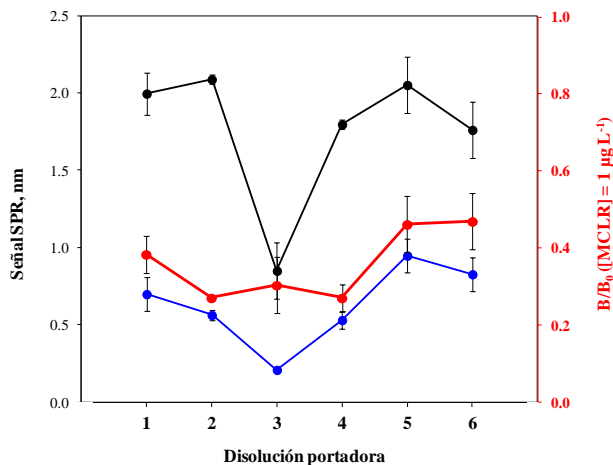
En relación a la **concentración de MCLR** empleada para la funcionalización del chip, se comprobó que al aumentar la concentración de la toxina en la disolución de inmovilización, se incrementa la sensibilidad del ensayo, obteniéndose un LOD menor y un DR más amplio. Como resultado del balance entre la mejora de las características analíticas del sensor y el consumo de MCLR (compuesto de elevado coste y alta toxicidad) requerido para su preparación, se seleccionó un valor optimo de MCLR de  $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Seguidamente se evaluó el efecto de distintas variables experimentales sobre la respuesta del inmunosensor: a) naturaleza y pH de la disolución portadora, b) naturaleza y concentración del anticuerpo, c) tiempos de incubación durante las distintas etapas del ensayo, d) empleo de agentes bloqueantes para disminuir las interacciones inespecíficas y, e) condiciones de regeneración de la superficie del sensor.

Para evaluar el efecto de la composición de la **disolución reguladora** sobre la reacción inmunoquímica, se midió la respuesta del biosensor, tanto en ausencia ( $B_0$ ) como en presencia de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de MCLR (MC10E7,  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), en distintos tampones incluyendo: PB, PBS (con un contenido en NaCl y KCl de 138 y 2.7 mM, respectivamente), tampón tris(hidroximetil)aminometano-HCl (TRIS), tampón glicina-hidróxido sódico (Gly/NaOH) y tampón bicarbonato (BC). Como se muestra en la Figura 43, el PBS permitió obtener la respuesta más sensible (menor  $B/B_0$ ), así como la mayor intensidad de señal en ausencia de MCLR ( $B_0$ ) y la mejor reproducibilidad en las medidas, por lo que se seleccionó para posteriores ensayos.

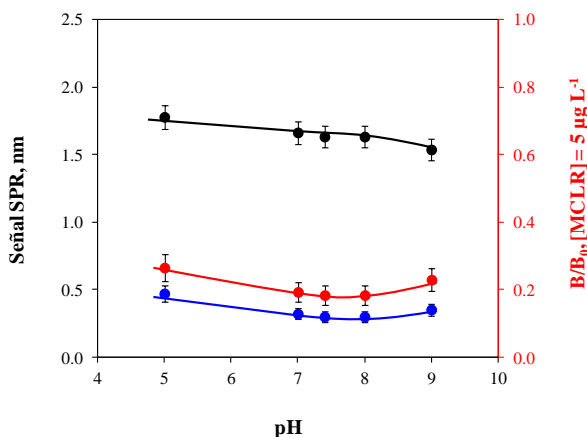
No se observaron diferencias significativas al variar el pH de la disolución amortiguadora en el intervalo de 5 a 9 (Figura 44), por lo que se fijó un valor de pH de 7.4 para el resto de los estudios.

Para el desarrollo del biosensor se evaluaron varios anticuerpos monoclonales, selectivos a MCs, procedentes de tres casas comerciales: 1) MAb, de Abkem Iberia S.L.; 2) MC10E7, de Alexis Biochemicals; y 3) los Abs C64C12 y C64A1, de HyTest Ltd. Los mejores resultados se obtuvieron con los anticuerpos MC10E7, que mostraron una unión inespecífica baja a la superficie del sensor ( $\sim 20\%$  de  $B_0$ ), originando una intensidad de señal adecuada en ausencia del analito ( $B_0 > 3 \text{ nm}$ , concentración de Ab

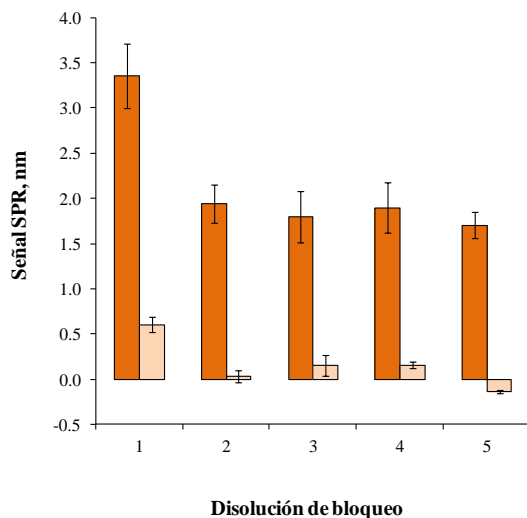


**Figura 43.** Influencia de la naturaleza de la disolución reguladora sobre la respuesta del biosensor en (•) ausencia y (•) presencia de MCLR  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . (•) Sensibilidad del ensayo ( $B/B_0$ ). Disolución portadora: (1) HEPES, (2) PBS, (3) Gly-NaOH, (4) BC, (5) TRIS y (6) PB.  $[\text{MC10E7}] = 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En todos los casos la disolución portadora presenta una concentración de tampón 10 mM y pH 7.4 ( $n = 3$ ).

$0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). La respuesta obtenida al emplear los anticuerpos procedentes de HyTest Ltd fue mucho menor ( $B_0 < 0.2 \text{ nm}$ ), mientras que la unión del MAb Abkem Iberia S.L. sobre la superficie sensora se atribuyó, principalmente, a una adsorción inespecífica.



**Figura 44.** Efecto del pH sobre la respuesta del biosensor en (•) ausencia y (•) presencia de MCLR  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . (•) Sensibilidad del ensayo ( $B/B_0$ ). Disolución portadora: PB 10 mM;  $[\text{MC10E7}] = 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; reacción inmunoquímica: 20 min,  $30 \mu\text{L min}^{-1}$  ( $n = 3$ ).

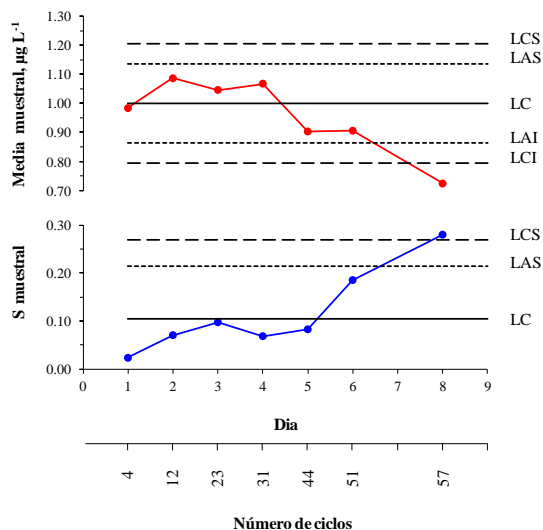


**Figura 45.** Influencia del empleo de agentes bloqueantes sobre la respuesta del biosensor. (1) Ensayo en ausencia de bloqueantes; ensayo tras bloqueo con: (2) SuperBlock® T20, (3) caseína, (4) gelatina y (5) BSA. Disoluciones de bloqueo, 10 mg mL<sup>-1</sup> en PBS (5 min, 30  $\mu$ L min<sup>-1</sup>). (■) Respuesta en ausencia de MCLR (B<sub>0</sub>) y (□) unión inespecífica del Ab sobre la superficie del chip SPR. Concentración MC10E7 = 0.2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Disolución portadora PBS. Reacción inmunoquímica, 20 min, 30  $\mu$ L min<sup>-1</sup> (n = 3).

Con el fin de reducir al máximo la unión inespecífica del anticuerpo sobre la superficie del chip SPR, lo que podría conducir a falsos positivos, se ensayaron cuatro agentes bloqueantes: SuperBlock® T20, caseína, gelatina y BSA. Tras la etapa de bloqueo se observó, en todos los casos, una disminución de la intensidad de la señal de referencia (B<sub>0</sub>, sin bloqueo), de ~40 % (Figura 45). Finalmente se seleccionó la disolución SuperBlock® T20 como bloqueante, ya que la intensidad de respuesta SPR (B<sub>0</sub>) era ligeramente superior a la obtenida empleando otros medios.

La concentración de anticuerpo se optimizó en el intervalo de concentraciones de 0.1 a 0.5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Al disminuir la concentración de anticuerpo de 0.5 a 0.2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> se observó un aumento en la sensibilidad del biosensor, obteniéndose un LOD de 0.07  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, frente al valor de 1.3  $\mu$ g L<sup>-1</sup> obtenido para 0.5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Además, el intervalo dinámico también se incrementó. Concentraciones inferiores de Ab (0.1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) reducen tanto la intensidad de la señal analítica como su reproducibilidad, por lo que se seleccionó una concentración de anticuerpo de 0.2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> para el ensayo.

Con el objetivo de regenerar la superficie sensora, permitiendo su reutilización sucesiva en más de un análisis, se han ensayado medios de distinta naturaleza, empleados habitualmente, en técnicas inmunoquímicas, para romper la interacción



**Figura 46.** Gráfico de control (Shewhart) construido para la respuesta del biosensor SPR frente a una disolución patrón de MCLR  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , ( $n = 3$ ). LC, línea central ( $\bar{x}$ ); LAS, línea de aviso superior ( $\bar{x} + 2s/\sqrt{n}$ ); LAI, línea de aviso inferior ( $\bar{x} - 2s/\sqrt{n}$ ); LCS, línea de control superior ( $\bar{x} + 3s/\sqrt{n}$ ); LCI, línea de control inferior ( $\bar{x} - 3s/\sqrt{n}$ ).

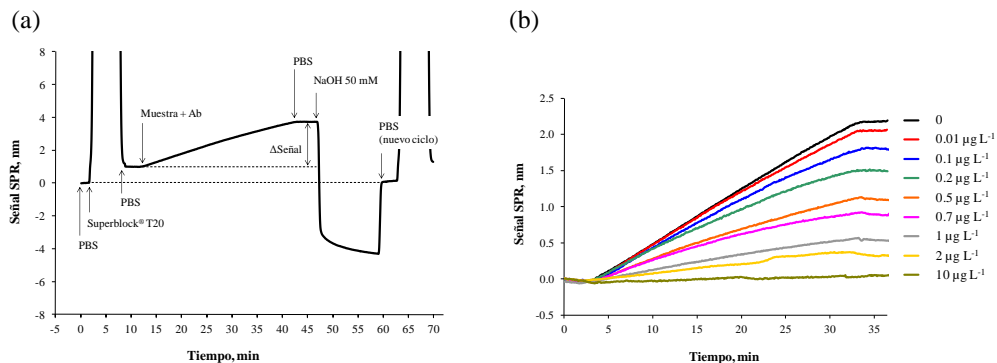
Ag-Ab, concretamente, medios de elevada fuerza iónica (NaCl) y medios a pH extremo, ácido (tampón glicina-HCl, pH 2.0; HCl) o básico (NaOH).

Los mejores resultados se obtuvieron empleando disoluciones a  $\text{pH} > 10$ , observándose la regeneración total de la superficie ( $99 \pm 5\%$ ) tras el tratamiento de la misma con NaOH 50 mM durante 15 min ( $30 \mu\text{L min}^{-1}$ ).

Para evaluar la estabilidad de de la superficie del chip tras sucesivas etapas de regeneración, se midió la respuesta del biosensor frente a una muestra patrón de MCLR  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , durante sucesivos ciclos. Los resultados que se muestran en la Figura 46 demuestran que la respuesta permanece constante durante  $> 50$  ciclos consecutivos, en el periodo de tiempo estudiado.

En la Figura 47 se muestra el perfil de respuesta obtenido con el biosensor durante un ciclo completo de medida, así como la respuesta obtenida para muestras de agua tamponada, enriquecidas con concentraciones crecientes de MCLR, en el intervalo de 0 a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Tras la optimización del inmunoensayo, se llevó a cabo la caracterización analítica del biosensor. El biosensor SPR optimizado presenta un límite de detección de  $73 \pm 8 \text{ ng L}^{-1}$ , un  $\text{IC}_{50}$  de  $0.67 \pm 0.09 \mu\text{g L}^{-1}$  y un intervalo dinámico de 0.2 a  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$ , para MCLR.



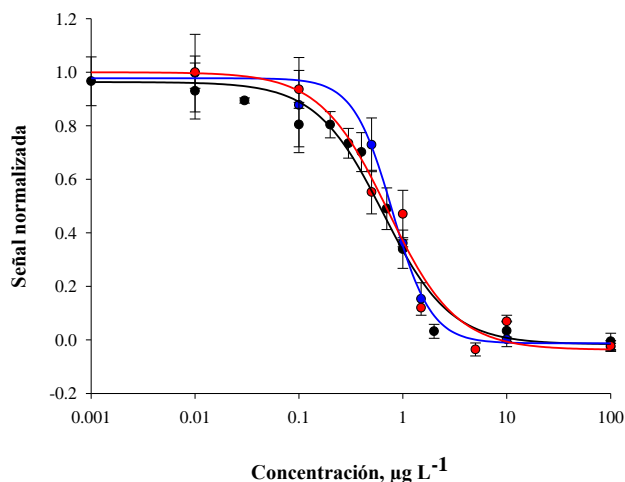
**Figura 47.** (a) Sensograma obtenido para la medida de una muestra libre de MCLR. (b) Perfil de respuesta obtenido con el biosensor SPR al llevar a cabo el análisis de muestras de MCLR patrón, con concentraciones comprendidas entre 0 y  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Se evaluó la reproducibilidad de la respuesta obtenida, tanto entre canales como entre ciclos de medida, obteniéndose valores de  $\text{RSD} < 13\%$  en todos los casos. Adicionalmente se estudió la reproducibilidad entre distintas superficies sensoras o biochips, obteniéndose valores entre el 5 y 15%, dependiendo de la concentración de MCLR ( $n = 4$ ).

El sensor SPR desarrollado presenta una sensibilidad superior a otros equipos basados en esta técnica de medida recogidos en la bibliografía [519], y un LOD comparable [137,526] o incluso menor que el descrito para otros inmunosensores [487,520,528]. Además, dado que el equipo de SPR empleado en su desarrollo incorpora una celda de medida de cuatro canales, el biosensor permite la monitorización simultánea y en tiempo real de hasta 4 muestras.

Se evaluó la reactividad cruzada frente a otras toxinas pertenecientes a la familia de las MCs: la microcistina-RR (MCRR, 88%) y la microcistina-YR (MCYR, 94%). El biosensor presenta una sensibilidad similar para todas las MCs evaluadas (Figura 48), por lo que puede emplearse para detectar y cuantificar la concentración total de tres de las MCs más abundantes en aguas superficiales (MCLR, MCRR y MCYR) en nuestro país [13].

Se evaluó la posible existencia de **efecto matriz**, construyendo la curva de respuesta del analito MCLR en muestras de agua potable (agua de grifo), previamente analizadas para comprobar que se encontraban libres de MCs (contenido de MCs por debajo del LOD del inmunosensor). No se han observado diferencias significativas (nivel de



**Figura 48.** Curva de calibrado normalizada correspondiente al inmunoensayo competitivo para la determinación de (•) MCLR; (•) MCRR y (•) MCYR ( $n = 3$ ).

confianza del 95%) entre las curvas de calibrado obtenidas en los distintos medios, por lo que la cuantificación de MCs puede realizarse directamente empleando un calibrado externo en disolución reguladora.

Por último, el biosensor se aplicó con éxito al análisis de MCLR en muestras de agua potable, enriquecidas con la toxina a concentraciones inferior al valor provisional de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  establecido por la WHO. Los resultados obtenidos permiten concluir que el biosensor SPR desarrollado es una herramienta muy útil para el análisis del contenido de MCLR en muestras de agua. Gracias a su elevada selectividad y su bajo LOD, permite el análisis directo de la muestra, sin necesidad de etapas previas de preconcentración y/o limpieza, a niveles por debajo del valor guía establecido por la WHO para esta toxina.

#### 5.2.2.2. Desarrollo de una micromatriz de biosensores para la determinación de microcistinas en aguas superficiales.

Como se ha descrito en el capítulo 5.2.2.1., el biosensor basado en SPR desarrollado en la presente Tesis permitió la determinación de MCLR a niveles de concentración inferiores a los fijados por la WHO para esta toxina en aguas potables. Sin embargo, aunque el mercado de los instrumentos de SPR ha crecido de forma considerable en los últimos años, la disponibilidad de instrumentos portátiles, de bajo coste y con buenas prestaciones analíticas, especialmente para la determinación de compuestos de bajo



peso molecular, sigue siendo limitada en comparación con los instrumentos basados en medidas de luminiscencia [568]. Además, en la actualidad, los equipos portátiles comerciales basados en esta técnica no permiten el análisis simultáneo de un elevado número de muestras, aunque los avances realizados en este campo en la última década han sido notables. Es por ello que en este trabajo se decidió sustituir la medida de SPR por la de fluorescencia para desarrollar el primer biosensor óptico descrito en bibliografía, basado en micromatrices de anticuerpos, para la determinación, *in situ*, de toxinas de la familia de las MCs en aguas superficiales.

Los sensores basados en detección de fluorescencia con onda evanescente tienen aplicación en muy diversos campos lo que ha facilitado la comercialización de dispositivos completamente automatizados y portátiles a costes moderados. En este sentido, en el presente trabajo se empleó un prototipo desarrollado por la empresa Hanson Technologies (USA), Inc., el Leopard Array Biosensor<sup>TM</sup> HLAB-2002 que integra los sistemas de excitación (diodo láser), detección (cámara CCD) y microfluidica en una sola unidad, y tiene la capacidad de realizar análisis múltiples (multimuestra y/o multianalito) empleando una guía de onda plana como superficie sensora (ver sección 2.1.2.2).

Basándonos en los resultados previos, obtenidos mediante espectroscopia por SPR (sección 5.2.2.1.), se seleccionó un formato de ensayo de tipo competitivo, en el cual, el receptor inmovilizado (MCLR) en la superficie de un vidrio portaobjetos de microscopio empleado como guía de onda plana (chip), compete con la MC presente en la muestra, por los sitios de unión de un Ab, selectivo a MCs, adicionado a la muestra. En una segunda etapa, la cantidad de anticuerpo unido a la superficie del chip se evalúa empleando un anticuerpo secundario marcado con una sonda fluorescente (cianina Cy5), que interacciona selectivamente con el anticuerpo fijado a la superficie sensora, obteniéndose una señal inversamente proporcional a la concentración de MC presente en la muestra analizada.

La unión covalente de la MCLR sobre la guía de onda se llevo a cabo empleando 3-(trimetoxisililpropil)dietilenetriamina (triamino-APMS) como agente silanizante ya que, según la bibliografía [569], los aminosilanos de cadena alquímica larga son mas resistentes a la hidrólisis que los de cadena corta cuando la superficie derivatizada se emplea en medio acuoso. No se observaron diferencias significativas en la respuesta del sensor al variar la concentración de silano, en el intervalo del 2 – 4 % (*v/v*). Sin embargo, la señal de fluorescencia en ausencia de analito aumentó de forma significativa al incrementar el tiempo de silanización del vidrio de 1 a 2 h, mejorando también la sensibilidad del biosensor (Tabla 20). Mayores tiempos de silanización (16 h)

**Tabla 20.** Parámetros de ajuste a la ecuación 3 de los datos experimentales obtenidos para diferentes tiempos de silanización. [Triamino-APMS] = 2% (v/v); [MCLR]<sub>funcionalización</sub> = 60 µg mL<sup>-1</sup>; Disolución portadora: PBS, pH 7.4; [MC10E7] = 0.4 µg mL<sup>-1</sup>; tiempo de incubación Ab + Ag, 20 min; [Cy5-Ab] = 5 µg mL<sup>-1</sup>; tiempo de incubación Cy5-Ab, 20 min; (n = 3).

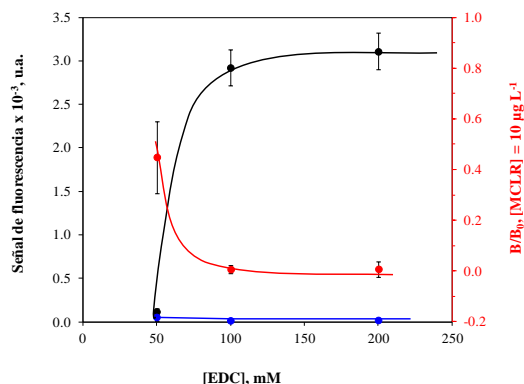
Parámetro	Tiempo de silanización, h		
	1	2	16
A <sub>max</sub> , u.a.	1470	2070	120
b	2.9	1.5	1.8
A <sub>min</sub> , u.a.	17	10	0.05
r <sup>2</sup>	0.998	0.993	0.997
Límite de detección, µg L <sup>-1</sup>	0.44	0.032	0.23
IC <sub>50</sub> , µg L <sup>-1</sup>	0.95	0.75	0.75
Intervalo dinámico, µg L <sup>-1</sup>	0.6 – 1.5	0.1 – 1.8	0.3 – 1.6

A<sub>max</sub>: asíntota máxima, b: pendiente en el punto de inflexión, IC<sub>50</sub>: concentración en el punto de inflexión, en µg L<sup>-1</sup>, A<sub>min</sub>: asíntota mínima.

originaron una importante disminución de la señal de fluorescencia, empeorando tanto las prestaciones del sensor como la precisión de las medidas. Este comportamiento se atribuyó a la formación de una multicapa de silano sobre el vidrio, que originaría una distribución irregular y poco reproducible de MCLR inmovilizada en la guía de onda plana. Por todo ello, para estudios posteriores, la silanización se llevó a cabo empleando una disolución al 2% (v/v) de triamino-APMS en tolueno, durante 2 h.

Se optimizaron las distintas variables experimentales que afectan a la **inmovilización de MCLR** sobre la superficie de la guía de onda funcionalizada con triamino-APMS, incluyendo la naturaleza y pH de la disolución portadora, la concentración de MCLR y EDC en disolución y el tiempo de activación de la MCLR con la mezcla EDC/NHS (formación del ester de N-hidroxisuccinimida), antes de su incubación sobre la superficie del portaobjetos.

Se investigaron dos disoluciones amortiguadoras para la inmovilización de la toxina: PBS 20 mM a pH 7.2 y MES 50 mM a pH 6.0 (con una concentración de NaCl 0.5M), obteniéndose mayor sensibilidad en la respuesta del biosensor en el segundo caso. No se observaron diferencias significativas al variar el pH del buffer en el intervalo de 5.5 – 6.5 o en presencia de concentraciones crecientes de NaCl (0 – 0.5 M), manteniendo

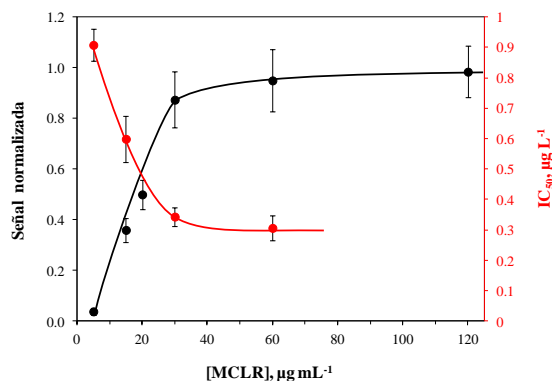


**Figura 49.** Efecto de la concentración de EDC empleada en la etapa de funcionalización de la superficie sensora sobre la respuesta del inmunosensor. Señal de fluorescencia medida en (•) ausencia ( $B_0$ ) y, (•) presencia de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de MCLR en muestra (B); (•) sensibilidad de la respuesta, en términos de  $B/B_0$ . Disolución portadora durante la etapa de funcionalización: MES 50 mM, pH 6.0; [MCLR] =  $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; [NHS] = 50 mM. Disolución portadora durante el ensayo: PBS, pH 7.4; [MC10E7] =  $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; tiempo de incubación Ab + Ag, 20 min; [Cy5-Ab] =  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; tiempo de incubación Cy5-Ab, 20 min. (n = 6).

constante la concentración de MES (50 mM), por lo que se eligió como medio más apropiado para la reacción el tampón MES 50 mM a pH 6.0.

El efecto de la **concentración de EDC** se evaluó en el intervalo de 50 a 200 mM, fijando las concentraciones de MCLR y NHS en  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$  y 50 mM, respectivamente. Al aumentar la concentración de reactivo, de 50 a 100 mM, se observó un incremento pronunciado de la intensidad de fluorescencia en ausencia de toxina ( $B_0$ ), y de la sensibilidad del ensayo (Figura 49). Concentraciones superiores de EDC no mejoraron la respuesta obtenida, por lo que se seleccionó una concentración de EDC 100 mM para llevar a cabo la inmovilización de MCLR sobre la guía de onda. No se observaron diferencias significativas en la respuesta del biosensor incubando previamente la MCLR con la mezcla de EDC/NHS (0 - 240 min), antes de la inmovilización sobre la guía de onda.

Un comportamiento similar se observó al variar la concentración de MCLR en la disolución de inmovilización. Como se muestra en la Figura 50, la intensidad de fluorescencia aumenta al incrementar la concentración de toxina hasta  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ , disminuyendo el LOD y el valor de  $\text{IC}_{50}$  y ampliándose el intervalo dinámico del biosensor. Para concentraciones superiores, la intensidad de la señal permanece constante. Por tanto, se escogió una concentración de MCLR de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  para posteriores etapas, lo que permite reducir significativamente el consumo de



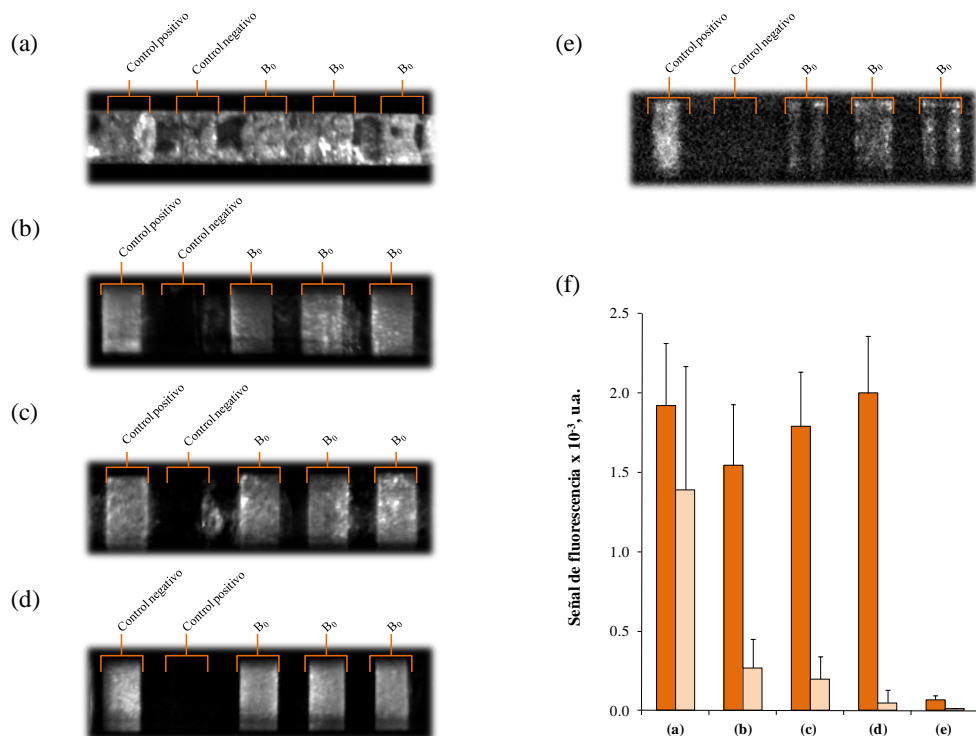
**Figura 50.** Efecto de la concentración de MCLR, durante la etapa de funcionalización de la superficie sensora, en la respuesta del inmunosensor. (•) Señal normalizada en ausencia de MCLR en la muestra ( $B_0$ ); (•) sensibilidad de la respuesta, en términos de  $IC_{50}$ . Disolución portadora durante la etapa de funcionalización: MES 50 mM, pH 6.0; [EDC] = 100 mM; [NHS] = 50 mM. Disolución portadora durante el ensayo: PBS, pH 7.4; [MC10E7] =  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; tiempo de incubación Ab + Ag, 20 min; [Cy5–Ab] =  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; tiempo de incubación Cy5–Ab, 20 min. ( $n = 6$ ).

hepatotoxina y, por tanto, el coste por ensayo, en comparación con el sensor SPR previamente desarrollado (sección 5.2.2.1).

Tras optimizar la etapa de funcionalización del chip, se evaluó el efecto de distintos parámetros que afectan al desarrollo del inmunoensayo.

Se evaluaron **métodos de bloqueo** para minimizar la unión inespecífica de bioreactivos o componentes de la matriz sobre la superficie sensora: métodos clásicos, basados en el empleo de disoluciones de proteínas (BSA, gelatina o caseína), de distinto peso molecular y, como método alternativo, se evaluó el perfluorooctiltriclorosilano (FOTS) en fase vapor, como agente bloqueante.

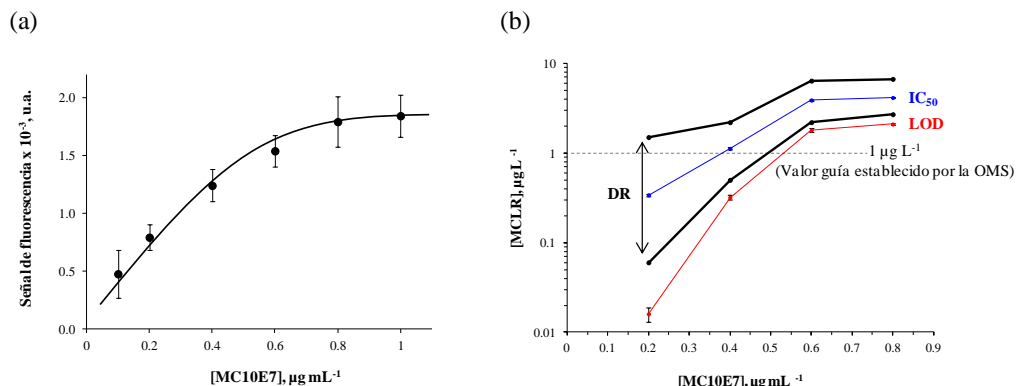
Como se muestra en la Figura 51.a, la señal de fondo obtenida en ausencia de agente bloqueante evidencia la necesidad de incluir esta etapa para obtener una buena sensibilidad analítica. Pese a los buenos resultados descritos por otros autores empleando FOTS en fase vapor [570], el bloqueo con este agente originó una disminución notable de la intensidad de fluorescencia medida tanto en ausencia como en presencia de analito ( $B_0 \sim 5\%$  de la señal medida en ausencia de agente bloqueante) (Figura 51.e), posiblemente como consecuencia de interacciones entre el silano FOTS y el residuo de guanidina de la MCLR inmovilizada, responsable del reconocimiento por parte del anticuerpo [135].



**Figura 51.** Influencia del empleo de agentes bloqueantes sobre la respuesta de la micromatriz de biosensores. Ensayo llevado a cabo: (a) en ausencia de agente bloqueante; empleando una disolución de (b) BSA, (c) gelatina o (d) leche (10 mg mL<sup>-1</sup> en PBS 20 mM, pH 7.4, 1 h); (e) tras bloqueo con FOTS en fase vapor (20 min). (f) Comparación de la eficacia de los distintos medios de bloqueo evaluados: (■) señal de fluorescencia en ausencia de MCLR (B<sub>0</sub>); (■) señal de fondo. Funcionalización de la guía de onda: MES 50 mM, pH 6.0; [MCLR] = 30 µg mL<sup>-1</sup>, [EDC] = 100 mM, [NHS] = 50 mM. Ensayo: disolución portadora, PBS pH 7.4; [MC10E7] = 0.4 µg mL<sup>-1</sup>; [anti-biotina MAb] = 0.4 µg mL<sup>-1</sup>; tiempo de incubación Abs + Ag, 20 min; [Cy5-Ab] = 2.5 µg mL<sup>-1</sup>; tiempo de incubación Cy5-Ab, 20 min. (n = 6).

Los mejores resultados se obtuvieron empleando una disolución de leche desnatada en polvo (mayoritariamente caseína), que permitió minimizar la señal de fondo incrementando la sensibilidad del biosensor (Figura 51.d). El empleo de otras proteínas, como BSA y gelatina, si bien mejoró significativamente la relación señal-fondo, originó una disminución de la sensibilidad del dispositivo entre el 10 y el 20%. Finalmente, se estableció una etapa de bloqueo de 90 min, con leche desnatada en polvo, 30 mg mL<sup>-1</sup>, en PBS para el resto de los ensayos.

En cuanto al tiempo de incubación Ag + Ab (**reacción inmunoquímica**) sobre la superficie sensora, se observó que, al aumentar este de 10 a 20 min, mejoraba la

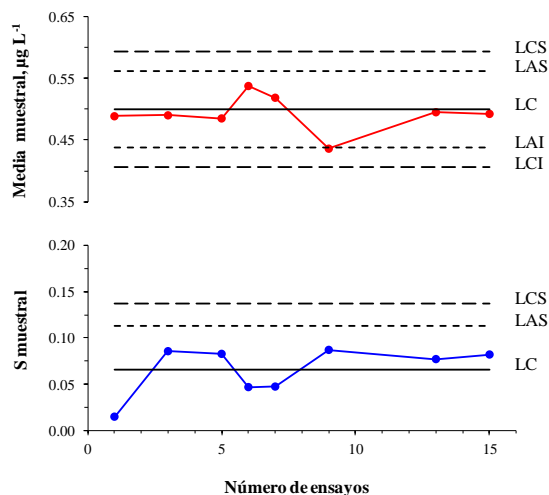


**Figura 52.** Efecto de la concentración de anticuerpo anti-MC (MC10E7) sobre: (a) la intensidad de fluorescencia medida en ausencia de analito ( $B_0$ ) y, (b) la sensibilidad del ensayo. (•) LOD, límite de detección; (•) IC<sub>50</sub>, concentración en el punto de inflexión de la curva (signoidal) de calibrado; (•) límites superior e inferior del intervalo dinámico (DR). Funcionalización de la guía de onda: MCLR 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , EDC 100 mM, NHS 50 mM en MES 50 mM, pH 6.0; Ensayo: disolución portadora, PBS pH 7.4; concentración anti-biotina MAb, 0.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; tiempo de incubación Abs + Ag, 20 min; concentración Cy5-Ab, 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; tiempo de incubación Cy5-Ab, 20 min. La barra de error corresponde al intervalo de confianza ( $\pm ts/\sqrt{n}$ , 95% confianza,  $n = 5$ ).

sensibilidad del inmunosensor, dando lugar a valores de LOD e IC<sub>50</sub> menores, que se mantuvieron constantes para tiempos superiores. Por todo ello se escogió un tiempo de incubación de 20 min como más apropiado para esta etapa.

En relación a la **etapa de revelado**, se llevó a cabo el inmunoensayo, variando el tiempo de incubación con el anticuerpo marcado, Cy5-Ab, en el intervalo de 10 a 30 min. Tiempos de incubación cortos (10 min) originaron señales de fluorescencia poco reproducibles y de baja intensidad. La señal máxima se obtuvo para tiempos de incubación igual o superiores a **20 min**, que fue el valor seleccionado para ensayos posteriores.

Por ultimo, se evaluó el efecto de la **concentración de anticuerpo anti-MC** (MC10E7) sobre la sensibilidad del ensayo, en el intervalo de 0.2 a 0.8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , midiendo la curva de respuesta del biosensor frente a muestras patrón de MCLR (0 a 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figura 52). Concentraciones menores de anticuerpo originaron una disminución tanto el valor IC<sub>50</sub> como del límite de detección del biosensor, obteniéndose intervalos de respuesta más amplios. No obstante, concentraciones muy bajas de anticuerpo (0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) produjeron señales de fluorescencia bajas y poco reproducibles. Por todo ello se seleccionó una concentración de Ab de 0.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que



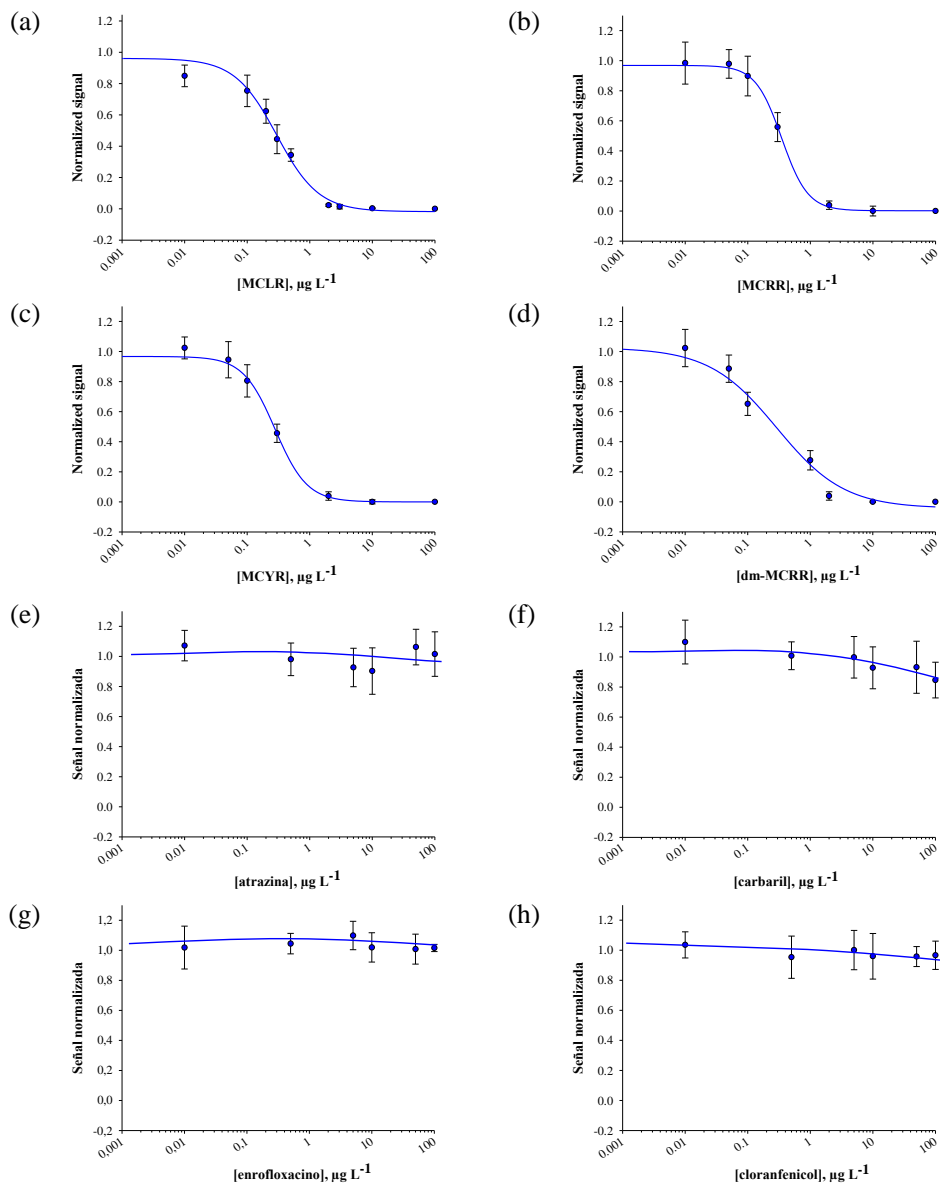
**Figura 53.** Gráfico de control (Shewhart) construido para la respuesta del biosensor frente a una disolución patrón de MCLR  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ , ( $n = 5$ ). LC, línea central ( $\bar{x}$ ); LAS, línea de aviso superior ( $\bar{x} + 2s/\sqrt{n}$ ); LAI, línea de aviso inferior ( $\bar{x} - 2s/\sqrt{n}$ ); LCS, línea de control superior ( $\bar{x} + 3s/\sqrt{n}$ ); LCI, línea de control inferior ( $\bar{x} - 3s/\sqrt{n}$ ). Medidas llevadas a cabo en un periodo de tiempo de 10 días.

proporciona la mejor sensibilidad así como una buena intensidad de señal y reproducibilidad en las medidas.

La superficie del sensor se regeneró empleando una disolución de NaOH (50 mM, 0.8 mL,  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ). Como se muestra en la Figura 53, la respuesta medida para una disolución patrón de MCLR  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  permanece constante durante al menos, 15 ciclos ensayo-regeneración, pudiéndose analizar al menos 90 muestras por biochip.

El biosensor optimizado presenta un LOD de  $16 \pm 3 \text{ ng L}^{-1}$ , un valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $0.34 \pm 0.01 \mu\text{g L}^{-1}$  y un DR de 0.06 a  $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ , con una sensibilidad superior a la de otros inmunosensores descritos en bibliografía para este analito, incluido el desarrollado en el marco de la presente Tesis, basado en medidas de SPR [487,519,520,526,528].

Como se ha descrito previamente, el anticuerpo utilizado para el desarrollo de la matriz de biosensores presenta reactividad cruzada frente a otras MCs con arginina en posición 4 [135]. Como se muestra en la Figura 54, el biosensor optimizado mostró una reactividad cruzada del 90% frente a MCRR, del 91% frente a MCYR y del 95% para dm-MCRR, que son junto a MCLR, tres de las MCs más abundantes en el medio ambiente.



**Figura 54.** Curva de calibrado normalizada correspondiente al inmunoensayo competitivo para la determinación de (a) MCLR; (b) MCRR; (c) MCYR; (d) dm-MCRR; (e) atrazina; (f) carbaril; (g) enrofloxacin; (h) clorfenicol.

El dispositivo puede realizar seis determinaciones simultáneas en 60 min y los chips se pueden reutilizar para varios ensayos sin una pérdida significativa de sus prestaciones analíticas, algo novedoso frente a otros resultados descritos en bibliografía empleando microarrays basados en onda evanescente.



**Tabla 21.** Figuras de mérito de los sensores selectivos a MCs descritos en las secciones 5.2.2.1 y 5.2.2.2 de la presente Tesis.

	Biosensor SPR <sup>(a)</sup>	Matriz de biosensores fluorescentes <sup>(a)</sup>
Límite de detección, $\mu\text{g L}^{-1}$	$0.073 \pm 0.008$	$0.016 \pm 0.003$
$\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{g L}^{-1}$	$0.67 \pm 0.09$	$0.34 \pm 0.01$
Intervalo dinámico, $\mu\text{g L}^{-1}$	0.2 – 2.0	0.6 – 1.5

<sup>(a)</sup>  $\pm \text{ts}/\sqrt{n}$ ,  $t_{95\%}$

Adicionalmente, se evaluó la respuesta del sensor en presencia de otros compuestos, no relacionados estructuralmente con la MCLR, como pesticidas (*i.e.* ATR, carbaril) o antibacterianos (*i.e.* ENRO, cloranfenicol), que pueden aparecer en aguas superficiales junto con las MCs (Figura 54). Cabe destacar que el sensor no responde a ninguno de los contaminantes estudiados, en el intervalo de concentraciones evaluado.

La precisión de la respuesta de la matriz de biosensores se evaluó en términos de reproducibilidad de la respuesta normalizada entre distintos canales de una misma guía de onda ( $n = 9$ ) en ausencia y en presencia de  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  de MCLR, obteniéndose valores de RSDs del 4 – 9 %. La reproducibilidad del calibrado entre distintas guías de onda ( $n = 3$ ), medidas en días diferentes, fue de 4 al 28% en el intervalo de concentración de MCLR de  $0.06$  a  $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

El biosensor desarrollado se aplicó al análisis de muestras de agua de río y lagos procedentes de cuatro áreas geográficas españolas, proporcionadas por el Centro de Estudios Hidrográficos (CEH-CEDEX, Madrid). Las muestras filtradas se analizaron directamente, tras ajustar el pH a 7.0 – 7.5 mediante la adición de sales de fosfato. Para la validación del biosensor, las muestras se analizaron en paralelo, mediante SPE-HPLC/ESI-MS/MS.

No se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos con ambos métodos de análisis, quedando demostrada la utilidad de la micromatriz de biosensores desarrollada para llevar a cabo este tipo de análisis, sin necesidad de tratamiento de muestra, empleando un instrumento portátil que permite el análisis simultáneo de hasta 6 muestras en 1 h (15 áreas de interrogación independientes por muestra), con buenos niveles de precisión y exactitud.

En la Tabla 21 se comparan las características analíticas de los dos inmunosensores desarrollados en la presente Tesis, para la determinación de microcistinas en aguas, basados en mecanismos de transducción ópticos.

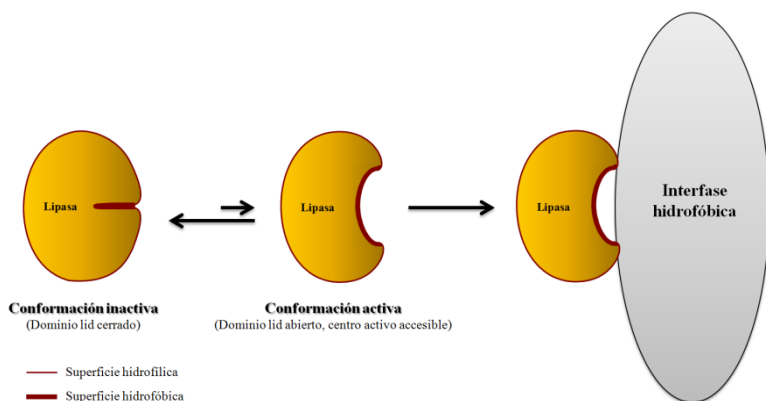
Aunque la matriz de biosensores desarrollada está basada en el mismo formato de ensayo que el biosensor de SPR (sección 5.2.2.1), su respuesta, en términos de LOD e  $IC_{50}$ , es significativamente más sensible, si bien el DR es ligeramente inferior. Entre las ventajas adicionales del *microarray* podemos destacar la posibilidad de llevar a cabo el análisis multimuestra, como se ha indicado anteriormente, y su facilidad de transporte para el análisis *in situ*, sin necesidad de control de temperatura que precisa el biosensor de SPR.

#### **5.2.2.3. Síntesis, caracterización y aplicación de conjugados proteicos de microcistina-LR para el desarrollo de biosensores ópticos.**

Uno de los pasos más complejos del proceso de fabricación de biosensores es el anclaje del receptor biológico sobre la superficie sensora. Nuestra experiencia previa en el desarrollo de inmunosensores para la detección de MCs en muestras medioambientales (secciones 5.2.2.1 y 5.2.2.2) nos permitió constatar el efecto crítico que ejercen tanto la naturaleza del receptor inmovilizado como el método empleado para su inmovilización, sobre la sensibilidad del ensayo y la unión no específica de biorreactivos y/o componentes de la matriz.

Cuando se trabaja con superficies sensoras planas, el empleo de agentes derivatizantes, tales como tioles o silanos, funcionalizados con distintos grupos reactivos para la posterior unión covalente de la molécula de interés al sustrato, conduce a la obtención de fases bidimensionales que, a menudo, están asociadas a una baja capacidad de carga, condicionando con ello la intensidad del biosensor y su intervalo dinámico. Estas limitaciones pueden solventarse, en algunos casos, utilizando superficies modificadas con estructuras que presentan una conformación tridimensional, como el dextrano o los geles de poliacrilamida o agarosa [571-574]. Sin embargo, son necesarios métodos alternativos para simplificar el proceso de fabricación de micromatrices de biosensores, que faciliten la inmovilización de moléculas de distinta naturaleza, especialmente ligandos de bajo peso molecular, sobre la superficie sensora mejorando la relación señal-ruido así como la posibilidad de reutilizar la superficie funcionalizada, reduciendo los costes de fabricación.

En este trabajo se llevó a cabo la síntesis de conjugados de lipasa-dextrano, para su posterior funcionalización con haptenos de bajo peso molecular como elementos de biorreconocimiento para la preparación del *microarray*. La enzima actúa como molécula



**Figura 55.** Mecanismo de activación interfacial de las lipasas [575]. El equilibrio entre la conformación cerrada de la lipasa (inactiva) y la conformación abierta (activa) se desplaza, mayoritariamente, hacia la conformación cerrada, en medio acuoso. En presencia de una interfase hidrofóbica (*i.e.* gota de sustrato, proteína o soporte), se desplaza hacia la conformación abierta, la cual interacciona con la interfase. Este mecanismo, exclusivo de estas enzimas, se conoce como activación interfacial.

portadora, mientras que el dextrano conjugado se comporta como “brazo espaciador”, para la posterior inmovilización covalente de la toxina (MCLR), lo que facilita el incremento de su concentración sobre la superficie sensora. Adicionalmente, las moléculas de MCLR inmovilizadas presentarán un menor impedimento estérico a la hora de interactuar con la región  $F_{ab}$  del anticuerpo, gracias al carácter hidrofílico y la flexibilidad de la red del polisacárido. La síntesis del conjugado se realizó en colaboración con el Grupo de Ingeniería de Biocatalizadores y Biotransformaciones dirigido por el Prof. Guisán, del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC.

Las lipasas solubles son enzimas capaces de adsorberse fuerte y selectivamente sobre superficies hidrofóbicas (*e.g.* soportes porosos, nanopartículas, etc), mediante un mecanismo similar a la activación interfacial que sufren en presencia de gotas de sustrato (Figura 55) [575].

La unión entre la lipasa y la superficie hidrofóbica solo revierte en presencia de altas concentraciones de surfactantes o codisolventes, lo que convierte a estas enzimas en proteínas portadoras muy interesante para la funcionalización de superficies con haptenos de bajo peso molecular. De hecho, las lipasas se pueden modificar químicamente cuando están adsorbidas sobre sólidos porosos hidrofóbicos (*e.g.* octil-agarosa), con la ventaja de que el centro activo, al estar protegido por el soporte, no se ve implicado en la reacción. Además, la derivatización de la enzima en fase sólida presenta indudables ventajas ya que se simplifican notablemente las etapas de lavado y

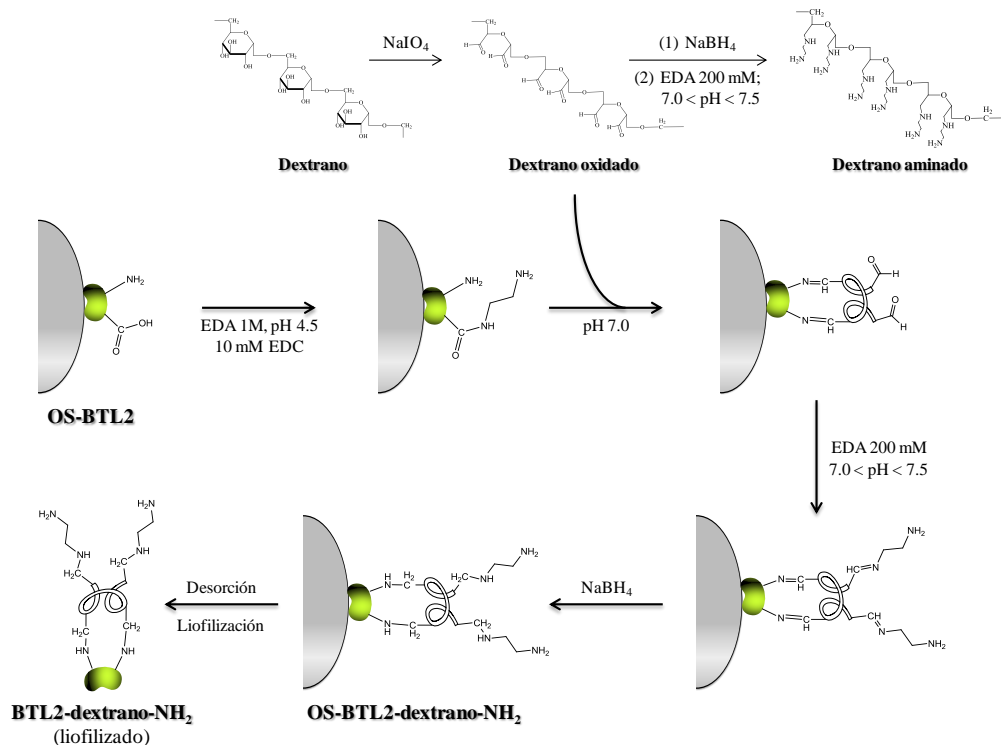


Figura 56. Síntesis de los conjugados BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub>.

eliminación de exceso de reactivos durante la síntesis. Tras la modificación, las enzimas se pueden desorber fácilmente empleando agentes surfactantes y la lipasa modificada, con el centro activo intacto, se podrá inmovilizar, posteriormente, sobre cualquier superficie hidrofóbica que se desee funcionalizar.

La lipasa seleccionada para llevar a cabo la **síntesis** de los conjugados preparados en este trabajo fue la lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus* BTL2, debido a que presenta una buena estabilidad térmica, así como en medios alcalinos o en presencia de disolventes orgánicos, lo que permite su modificación química y su conjugación a compuestos poliméricos [576].

La derivatización de la lipasa con el dextrano se llevó a cabo en fase sólida (Figura 56), adsorbiendo hidrofóticamente la BTL2 sobre un soporte comercial de octil-agarosa (OS), a través de su centro activo. Se confirmó, espectrofotométricamente, que la modificación empleando este procedimiento no había afectado significativamente a su actividad, reteniéndose más del 80% de la actividad enzimática inicial.

La conjugación de la BTL2 con la red de dextrano se confirmó por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía Raman, en colaboración con el grupo dirigido por la Prof. Domingo (Instituto de Estructura de la Materia-CSIC). Los espectros obtenidos para los conjugados BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub>, liofilizados, se compararon con los de la BTL2 sin modificar, el dextrano, el dextrano oxidado (aldehído dextrano), y el dextrano aminado.

El espectro FTIR para la BTL2 presentó el mayor número de bandas de absorción en la región de 1900 a 1200 cm<sup>-1</sup>, correspondientes al grupo peptídico: la banda amida I (1700 - 1600 cm<sup>-1</sup>), asociada principalmente con la vibración de tensión del C=O; la banda amida II (1580 - 1510 cm<sup>-1</sup>), relacionada con la vibración de flexión del enlace N-H y la vibración de tensión de los enlaces C-N; y la banda amida III (1400 - 1200 cm<sup>-1</sup>) debida a vibración de flexión del enlace N-H y vibración de tensión de C-C<sub>α</sub> y C-N.

Los dextranos presentan bandas de absorción asociadas a la cadena polimérica entre 1200 - 900 cm<sup>-1</sup>, relacionadas principalmente a un fuerte acoplamiento de las vibraciones de tensión C-C y C-O y vibraciones de deformación C-O-C y C-O-H [577,578]. El espectro FTIR para los derivados de dextrano (dextrano oxidado y dextrano aminado) fue muy similar, con bandas correspondientes a distintos grupos funcionales: una banda ~1730 cm<sup>-1</sup> asociada a la vibración de tensión del C=O de los grupos aldehído, en el caso del dextrano oxidado (aldehído dextrano), o una banda ~1665 cm<sup>-1</sup> correspondiente a vibraciones de flexión del enlace N-H (amina) [579,580].

Tras la conjugación de la cadena de dextrano, se observaron cambios en las bandas amida I y amida III, características de la proteína, así como un pronunciado incremento de la *banda de carbohidrato*, entre 900 - 1200 cm<sup>-1</sup>, asociado a la cadena polimérica conjugada. La banda débil, correspondiente a vibraciones C-N (amina) en la región 1130 - 1190 cm<sup>-1</sup>, quedó oculta por las bandas, más intensas, de dextrano. Además, la presencia de grupos amina secundaria se puso de manifiesto mediante un incremento de la intensidad de la banda debida a las vibraciones de tensión N-H, entre 3300 - 3500 cm<sup>-1</sup>.

Adicionalmente, la caracterización del conjugado BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> reveló la presencia de residuos del surfactante (laurato de sucrosa) empleado en la desorción del soporte de OS, que se tradujo en la aparición de tres bandas en el espectro FTIR: dos bandas en la región ~2900 cm<sup>-1</sup>, debidas a vibraciones de tensión C-H, y una banda ~1750 cm<sup>-1</sup>, correspondiente a vibraciones de tensión C=O.

Dado que el laurato de sucrosa presenta una dispersión Raman mucho más intensa que las proteínas y los polisacáridos (*i.e.* dextrano), la presencia de surfactante, incluso

en cantidades traza, ocultó las bandas Raman características del conjugado BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub>.

Con la intención de corroborar los datos observados en FTIR, se sintetizó, en paralelo, el conjugado de albúmina de suero bovino, BSA-dextrano-NH<sub>2</sub> en fase homogénea (disolución), evitando el uso de laurato de sucrosa. Al igual que en el caso de la lipasa BTL2, el espectro FTIR obtenido para este compuesto mostró las bandas de carbohidrato (1200 - 900 cm<sup>-1</sup>), asociadas a la cadena polimérica, una banda (3300 - 300 cm<sup>-1</sup>) asignada a las vibraciones de tensión N-H, así como en un incremento de la intensidad de la banda debida a las vibraciones de tensión C-H alifático (3000 cm<sup>-1</sup>), banda que, en el caso del conjugado BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub>, quedó oculta por las bandas asociadas al surfactante, más intensas. Estas observaciones están de acuerdo con los resultados descritos en bibliografía para mezclas colágeno-dextrano [577].

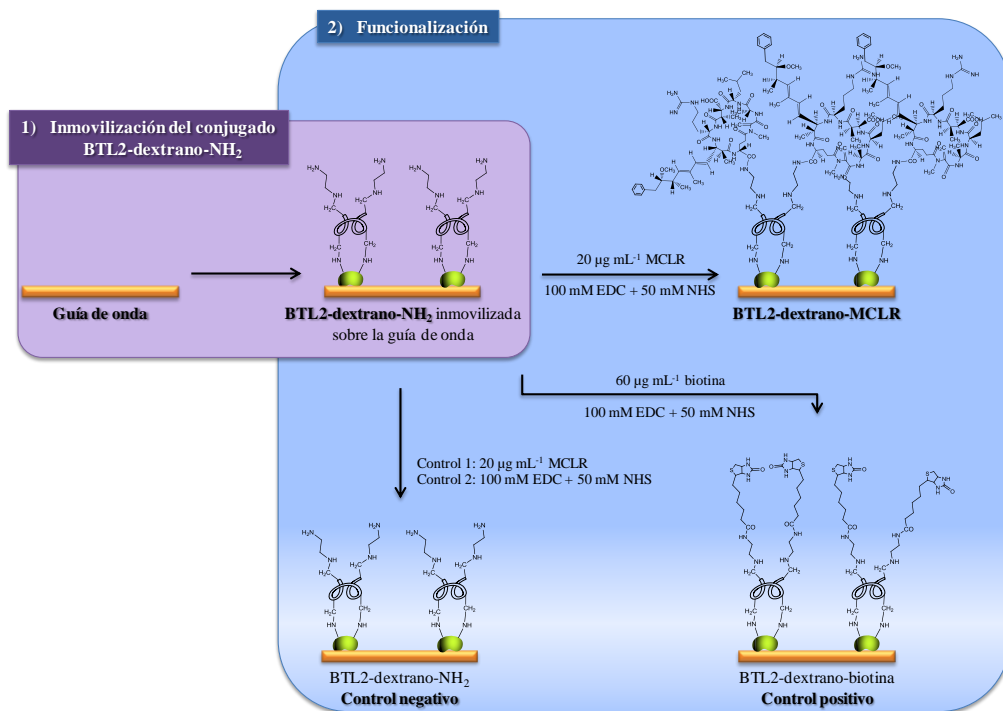
Dada la similitud de los espectros FTIR, para los conjugados BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> y BSA-dextrano-NH<sub>2</sub>, se puede pensar que la conjugación del dextrano es similar en ambos casos, por lo que se procedió a caracterizar el conjugado BSA-dextrano-NH<sub>2</sub> por espectroscopía Raman, evitando así la interferencia del surfactante.

El espectro Raman obtenido para BTL2 y BSA fue similar, presentando las bandas típicas de proteína, asociadas al esqueleto de carbono (amida I, 1650 cm<sup>-1</sup>), vibraciones de deformación C-H (1450 y 1341 cm<sup>-1</sup>), amida III (1240 cm<sup>-1</sup>) y a los residuos de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) [581,582].

Comparando los espectros Raman obtenidos para el dextrano aminado y el dextrano, se observó un desplazamiento hacia el rojo de las bandas asociadas a las vibraciones de tensión C-H (~2900 cm<sup>-1</sup>), un incremento de la intensidad de la banda ~1465 cm<sup>-1</sup> (deformación de enlaces C-H), un incremento, aunque menor, de la intensidad de las bandas en la región 3100 - 3400 cm<sup>-1</sup>, donde aparecen las bandas debidas a vibraciones de tensión de enlace N-H (amina), así como la presencia de tres nuevas bandas a 1190, 1150 y 1045 cm<sup>-1</sup>, asociadas a las aminas secundarias [583].

El espectro Raman del conjugado BSA-dextrano-NH<sub>2</sub> mostró las bandas características tanto del espectro del dextrano aminado, como del espectro de la proteína (*i.e.* bandas a 1658 cm<sup>-1</sup> y 1606 cm<sup>-1</sup>, correspondientes a amida I y vibraciones de tensión del anillo aromático de la fenilalanina, respectivamente), lo que confirma la formación de la quimera proteína-dextrano.

Tras su caracterización, el conjugado BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> se aplicó al desarrollo de la matriz de sensores selectivos a MCs.



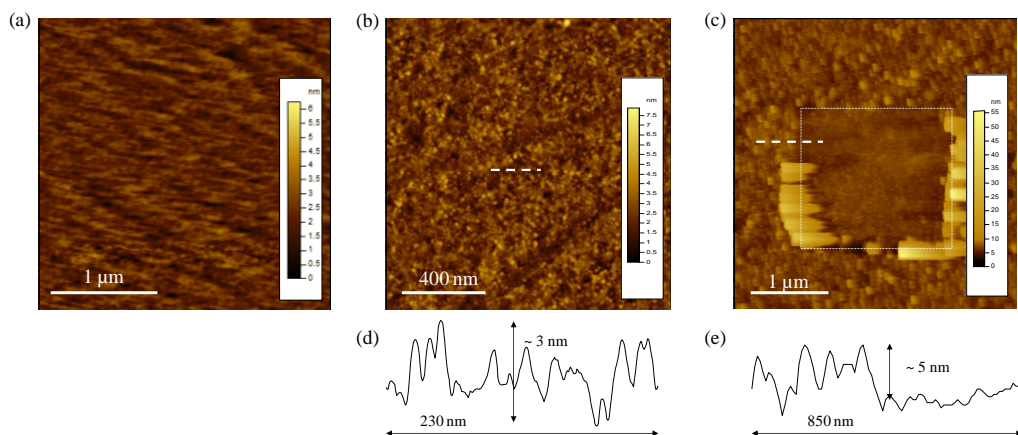
**Figura 57.** Funcionalización de la superficie sensora empleada como guía de onda plana.

La **funcionalización** de la superficie del portaobjetos de vidrio empleado como guía de onda se llevó a cabo en dos etapas (Figura 57): 1) adsorción hidrofóbica del conjugado BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub>, y 2) unión covalente de MCLR al conjugado, a través de los grupos amino presentes en la red de dextrano de la quimera.

Dado que la inmovilización del conjugado se produce principalmente a través de interacciones hidrofóbicas entre el centro activo intacto de la lipasa y el vidrio, la red de dextrano estará orientada hacia el exterior, favoreciendo la inmovilización de la MCLR en la segunda etapa. Por otra parte, en principio, la unión de la lipasa al soporte hidrofóbico es reversible.

Tras la funcionalización, la superficie sensora resultante se empleó en el desarrollo de inmunoensayos de tipo competitivo.

La inmovilización del conjugado sobre la guía de onda sin modificar (vidrio) condujo a una respuesta de fluorescencia muy baja en ausencia de MCLR (B<sub>0</sub>), con medidas poco reproducibles, lo que se atribuyó a un bajo rendimiento en la adsorción del conjugado debido a la naturaleza hidrofílica del vidrio empleado como guía de onda.



**Figura 58.** Topografía de la superficie de vidrio empleada como guía de onda, mediante AFM: (a) funcionalizada con HDMS; (b) funcionalizada con HDMS, tras incubar con una disolución de BTL2 ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  en PB, 30 min). (c) Aplicación de la técnica de raspado sobre un portaobjetos funcionalizado con HMDS e incubado con BTL2 ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  en PB, 30 min). (d) y (e) Perfil topográfico a lo largo de la línea discontinua en (b) y (c), respectivamente.

La señal analítica mejoró tras modificar el vidrio con distintos agentes silanizantes (*i.e.* HMDS, FOTS o DMDMS) antes de proceder a la inmovilización de los conjugados BTL2–dextrano–MCLR. De los agentes silanizantes evaluados, se seleccionó el HMDS, ya que su empleo condujo a las superficies sensoras más homogéneas, con mayor sensibilidad al analito y buena reproducibilidad entre medidas.

La caracterización de la topografía de la superficie de las guías de onda desarrolladas en este trabajo se realizó mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), en colaboración con el Dr. Olea y la Dra. Vélez del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC. De acuerdo a las micrografías de AFM obtenidas cuando se emplean guías de onda funcionalizadas con HMDS, tanto la lipasa (BTL2) como el conjugado (BTL2–dextrano– $\text{NH}_2$ ) se inmovilizan formando monocapas sobre la superficie del vidrio.

En la Figura 58 se muestran las imágenes obtenidas mediante AFM para una guía de onda funcionalizada con HMDS, antes y después de la inmovilización de la lipasa. Como puede observarse, la BTL2 se inmoviliza formando glóbulos, con una altura de 1 a 3 nm (Figuras 58.b y 58.c). El valor  $R_q$  observado fue de  $0.74 \text{ nm}$ , lo que sugiere la formación de monocapas de lipasa [584].

La presencia de una monocapa de BTL2 se confirmó mediante el raspado (*scratching*) de la superficie, barriendo un área de la misma, en modo contacto, con una fuerza



normal elevada. Posteriormente se llevó a cabo un segundo barrido, en modo *tapping*, ampliando el área de estudio. La altura del orificio originado mediante el raspado (Figura 57.c), resultó de unos 5 nm, lo que concuerda con los datos obtenidos para la lipasa BTL2 mediante difracción por Rayos-X [585].

A continuación se evaluó el efecto de distintos parámetros que afectan a la eficacia de la **inmovilización del conjugado** sobre la superficie silanizada: naturaleza de la disolución portadora, concentración de BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> y tiempo de incubación.

Como disolución portadora, se evaluaron dos medios tamponados, PB (10 – 50 mM; pH 7.0) y TRIS (50 mM, pH 7.6), y agua Milli-Q. Adicionalmente, y debido a la tendencia de la lipasa BTL2 a formar agregados [586], se estudió el efecto de la presencia, en la disolución portadora, de un disolvente orgánico (2-propanol, 30% (v/v)) o un surfactante (Tween 20 o Triton X100, 0.05 – 0.5 %, (v/v)), sobre la homogeneidad de la superficie obtenida tras la inmovilización del conjugado. A partir de los resultados obtenidos mediante AFM y considerando los problemas de solubilidad de la quimera en medio acuoso, se decidió llevar a cabo la inmovilización del conjugado BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> en PB (10 mM, 0.15 M NaCl, pH 7.0).

No se observaron diferencias significativas en la topografía de la monocapa de lipasa depositada sobre la guía de onda, medida con AFM, en el intervalo de concentraciones evaluado (0.5 – 1 mg mL<sup>-1</sup>), siendo necesarios 30 min de incubación para la formación de una monocapa homogénea de conjugado. Tiempos de incubación superiores no afectaron a la homogeneidad de la monocapa adsorbida.

A la vista de los resultados obtenidos, para asegurar la formación de una monocapa reproducible de BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> sobre la superficie del vidrio silanizado, se decidió inmovilizar éste incubando la guía de onda, funcionalizada con HDMS, con una disolución 0.5 mg mL<sup>-1</sup> en PB (10 mM, 0.15 M NaCl, pH 7.0), durante 30 min.

Uno de los parámetros más importantes en la respuesta del biosensor fue el **peso molecular (MW) del dextrano** unido a la BTL2. Para evaluarlo se sintetizaron 5 conjugados BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub>, empleando dextranos de MW entre 1.5 a 40 kDa. Para la derivatización de la enzima se empleó, en todos los casos, la misma masa de dextrano, independientemente de su MW.

Se observó una disminución del rendimiento de desorción del conjugado (a partir del soporte OS), al aumentar el MW del dextrano empleado durante la síntesis, que podría explicarse considerando que, al aumentar el tamaño del polisacárido, pueden formarse conjugados compuestos por varias moléculas de lipasa enlazadas a una misma molécula de dextrano. Dado que los dextranos presentan una conformación lineal de

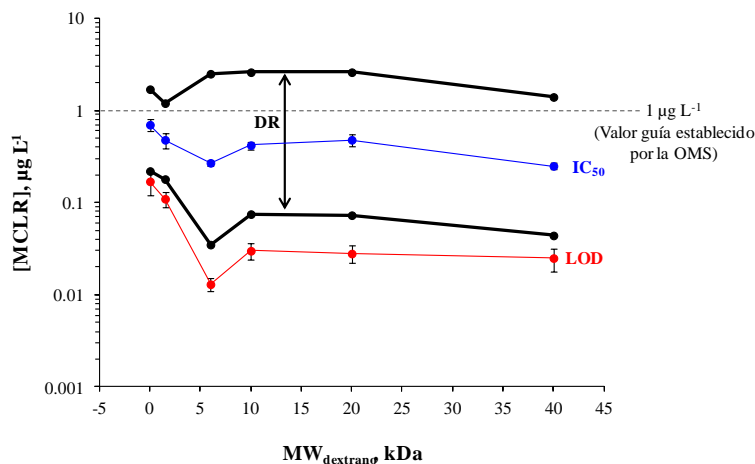
elevada flexibilidad, y que la BTL2 se encuentra inmovilizada sobre el soporte, al aumentar el tamaño/longitud del polisacárido, aumenta la probabilidad de que una única molécula de dextrano se conjuga a más de una molécula de lipasa.

Las superficies resultantes de la incubación de la guía de onda, funcionalizada con HMDS, con cada uno de los conjugados sintetizados, se caracterizó mediante AFM, observándose topografías con una rugosidad ( $R_q$ ) de 0.66, 1.23, 1.25, 1.33 y 1.64 nm para BTL2-dextrano (1.5 kDa)-NH<sub>2</sub>, BTL2-dextrano (6 kDa)-NH<sub>2</sub>, BTL2-dextrano (9-11 kDa)-NH<sub>2</sub>, BTL2-dextrano (15-25 kDa)-NH<sub>2</sub>, y BTL2-dextrano (40 kDa)-NH<sub>2</sub>, respectivamente.

No se observaron diferencias significativas entre las topografías medidas con AFM para superficies funcionalizadas con el conjugado BTL2-dextrano (1.5 kDa)-NH<sub>2</sub> o con BTL2 sin modificar, lo que sugiere que las dimensiones de la lipasa no varían de forma significativa tras su conjugación con dextrano 1.5 kDa, ya sea por el tamaño relativamente pequeño del mismo respecto a las dimensiones de la lipasa, o por un bajo grado de conjugación.

Todos los conjugados sintetizados, excepto el conjugado BTL2-dextrano (40 kDa)-NH<sub>2</sub>, se inmovilizaron sobre la guía de onda dando lugar a monocapas homogéneas de topografía similar, de acuerdo a los estudios de AFM, las cuales presentaron globulos de hasta 5 nm de altura. El conjugado BTL2-dextrano (40 kDa)-NH<sub>2</sub> originó superficies de diferente topografía, con globulos de 1 - 6 nm en altura, separados entre sí por una distancia de hasta 60 nm. Esto podría deberse a que, al tratarse del dextrano de mayor peso molecular, el volumen que ocupa también aumenta, limitando físicamente el acercamiento entre distintas moléculas de lipasa inmovilizadas, al tiempo que las interacciones entre moléculas vecinas, a través de la red polimérica, originan la formación agregados mayores.

Tras la inmovilización de los distintos conjugados, las guías de onda se incubaron con una disolución de MCLR 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , en MES 50 mM a pH 6.0, en presencia de EDC 100 mM y NHS 50 mM (Figura 57). Posteriormente, las superficies de vidrio tapizadas con los conjugados BTL2-dextrano-MCLR se bloquearon con una disolución de leche desnatada en polvo al 3% ( $m/v$ ) en PBST (PBS con 0.5% ( $v/v$ ) Tween 20) durante 2 h. Por último, cada una de las fases sensoras se aplicó al análisis de disoluciones patrón de MCLR en el intervalo de concentraciones de 0 - 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , comparando su respuesta con la proporcionada por la superficie resultante de la inmovilización directa de MCLR.



**Figura 59.** Efecto del peso molecular (MW) del dextrano empleado en la síntesis de conjugado BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub>, sobre la respuesta del biosensor. (•) LOD, límite de detección; (•) IC<sub>50</sub>, concentración en el punto de inflexión de la curva (signoidal) de calibrado; (•) límites superior e inferior del intervalo dinámico (DR). La barra de error corresponde al intervalo de confianza ( $\pm ts/\sqrt{n}$ , 95% confianza,  $n = 3$ ).

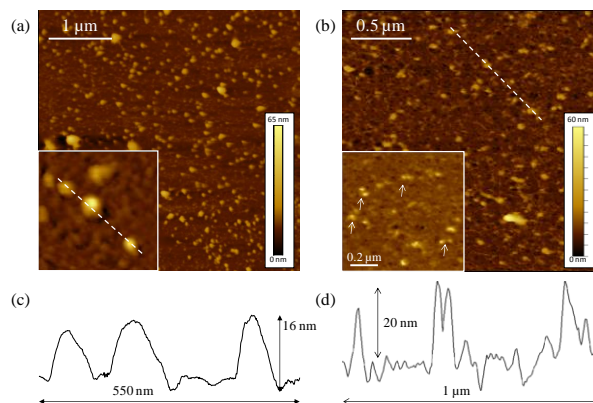
La mejor respuesta, en términos de IC<sub>50</sub> y LOD se obtuvo con el conjugado BTL2-dextrano (6 kDa)-NH<sub>2</sub>, que originó el biosensor con menor LOD e intervalo dinámico más amplio (Figura 59).

Las curvas de respuesta, obtenidas en para cada una de las superficies sensoras, se ajustaron a la ecuación de Sips [587], determinándose el parámetro Sips ( $\alpha$ ), que describe el grado de unión tridimensional de la superficie sensora. La ecuación (en el caso de los ensayos de inhibición de la unión empleando datos normalizados) viene dada por la ecuación (6):

$$Y = 1 - \left( \frac{c}{k + c} \right)^\alpha \quad (6)$$

donde Y es la fracción de analito unido, c es la concentración de analito en disolución, k es el coeficiente de disociación y  $\alpha$  es el parámetro de Sips. Para valores de  $\alpha = 1$ , la ecuación se equipara a la ecuación de Langmuir, que describe una adsorción bidimensional sobre la superficie (monocapa). Para valores de  $\alpha < 1$ , la ecuación describe un mecanismo de acumulación, análogo a la adsorción de analito en una tercera dimensión (i.e. una capa con un espesor determinado) [588].

Cuando se inmovilizó la MCLR directamente o *via* conjugado BTL2-dextrano (1.5 kDa)-MCLR sobre el sustrato de vidrio, el mecanismo de unión observado fue el

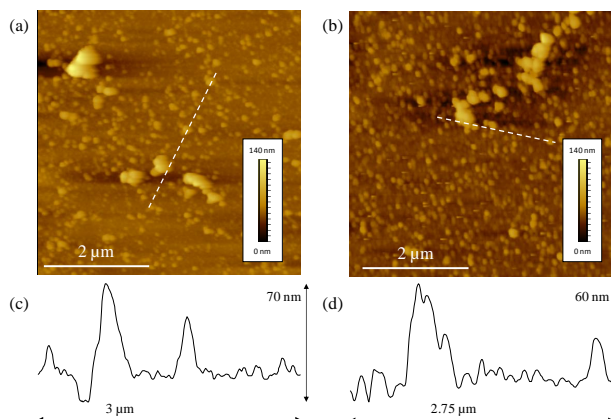


**Figura 60.** (a) Imagen AFM de la superficie sensora tras incubación con el anticuerpo MC10E7 ( $1\mu\text{g mL}^{-1}$ , 20 min). En el recuadro se muestra un zum de la muestra, de  $0.5 \times 0.5\ \mu\text{m}^2$ . (b) Imagen AFM de la superficie sensora tras la etapa de revelado (DyLight-649-Ab,  $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ , 20 min). En el recuadro se muestra una ampliación de la imagen de la muestra, de  $0,8 \times 0,8\ \mu\text{m}^2$ . Las flechas indican la presencia de pares de glóbulos. (c) y (d) muestran el perfil topográfico a lo largo de la línea discontinua en (a) y (b), respectivamente.

característico de una capa 2D, con un valor  $\alpha = 1$ . Sin embargo, cuando se emplearon conjugados sintentizados con dextranos de mayor peso molecular, el valor de  $\alpha$  disminuyó significativamente, presentando un valor mínimo de 0.5 para el conjugado BTL2-dextrano (6 kDa)-MCLR. Esto podría explicarse considerando que el empleo de conjugados sintetizados con polisacáridos de  $\text{MW} \geq 6\ \text{kDa}$  origina la formación de superficies de bioreconocimiento tridimensionales, en las que el hapteno se encuentra inmovilizado en todo el volumen de la capa, aumentando la sensibilidad del ensayo (menor LOD e  $\text{IC}_{50}$ ) y la amplitud del DR de respuesta del biosensor. Por tanto, se seleccionó el conjugado BTL2-dextrano (6 kDa)- $\text{NH}_2$  para la preparación de la matriz de sensores, caracterizándose, mediante microscopia AFM, la topografía de la superficie sensora en el curso del inmunoensayo.

En una primera etapa la guía de onda, modificada con el conjugado, se incubó con el Ab selectivo a MC (MC10E7), observándose la aparición de glóbulos con alturas entre 12 y 22 nm sobre la superficie (Figuras 60.a y 60.c). Estos valores concuerdan con el tamaño de una IgG, con ligeras variaciones atribuidas a distintas orientaciones del Ab unido sobre la monocapa de BTL2-dextrano (6 kDa)-MCLR. Mediante el raspado (scratching) de la superficie entre glóbulos se confirmó la presencia de una monocapa de conjugado.

Tras la etapa de incubación con el Ab secundario (DyLight649-Ab), la superficie presentó un mayor número de dominios, con alturas entre 16 y 20 nm (Figuras 60.b y



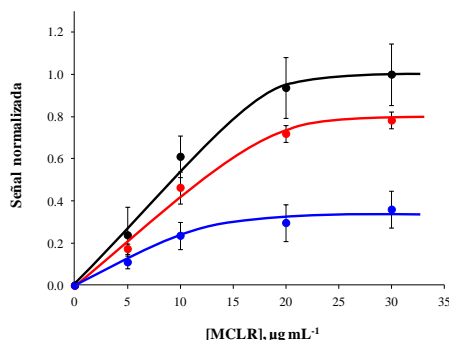
**Figura 61.** Imágenes AFM correspondientes a la superficie control, resultante de la inmovilización directa de MCLR sobre la guía de onda funcionalizada con HMDS, (a) tras incubación con el anticuerpo MC10E7 ( $1\mu\text{g mL}^{-1}$ , 20 min) y (b) tras la etapa de revelado (DyLight-649-Ab,  $10\mu\text{g mL}^{-1}$ , 20 min). (c) y (d) muestran el perfil topográfico a lo largo de la línea discontinua en (a) y (b), respectivamente.

60.d). Cuando se aplica la imagen, se aprecia la existencia de numerosos dominios formados por la agrupación de dos globulos, con una altura de  $\sim 20\text{ nm}$  y anchuras próximas a  $150\text{ nm}$ , que se atribuyeron a conjugados MC10E7 – DyLight-649-Ab.

De nuevo, raspando un área libre de agregados, se confirmó la presencia de una monocapa de  $5\text{ nm}$ , atribuida a los conjugados BTL2-dextrano ( $6\text{ kDa}$ )-MCLR inmovilizados sobre la superficie sensora.

Una superficie control, preparada en ausencia de conjugado BTL2-dextrano- $\text{NH}_2$ , inmovilizando directamente MCLR sobre el vidrio silanizado, presentó una topografía globular mucho más polidispersa que la observada para las quimeras, con agregados de  $10 - 100\text{ nm}$  de altura tras la incubación con el Ab MC10E7, y de hasta  $140\text{ nm}$  tras la incubación con el anticuerpo secundario (Figura 61), lo que confirma la utilidad del conjugado para la preparación de superficies moleculares muy ordenadas y homogéneas, con una elevada capacidad de carga para la inmovilización de haptenos de bajo peso molecular sobre la guía de onda plana.

Tras la selección del conjugado, se evaluó el **efecto de la concentración de MCLR** en la disolución de tapizado, empleando concentraciones crecientes de la toxina, en el intervalo de  $5$  a  $30\mu\text{g mL}^{-1}$ . La intensidad de la respuesta de biosensor, en ausencia de MCLR ( $B_0$ ) aumentó al incrementar la concentración MCLR, alcanzando una intensidad máxima para una concentración igual o superior a  $20\mu\text{g mL}^{-1}$  de MCLR, que se eligió para posteriores ensayos (Figura 62).



**Figura 62.** Efecto de la concentración de MCLR empleada en la etapa de funcionalización de la guía de onda, sobre la respuesta del sensor en ausencia de analito ( $B_0$ ). Disolución portadora durante la etapa de funcionalización, MES 50 mM, pH 6.0, EDC 100 mM, NHS 50 mM; disolución portadora durante el ensayo: PBS (Tween 20, 0.05% (v/v), leche 0.3% (m/v), pH 7.4); concentración de MC10E7, (•) 0.05, (•) 0.1 y (•) 0.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (incubación, 20 min); DyLight-649-Ab, 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (incubación, 20 min), ( $n = 3$ ).

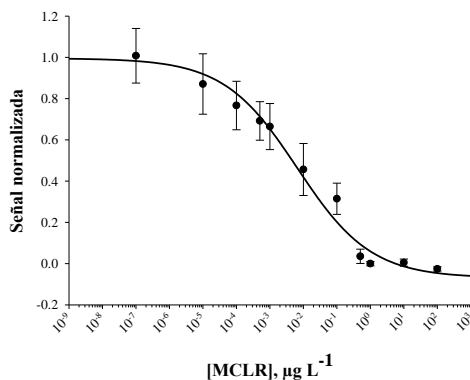
Para evaluar el efecto de la concentración de Ab MC10E7 se midió la respuesta del biosensor frente a disoluciones patrón de MCLR (0 – 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), empleando concentraciones de Ab en el intervalo de 0.1 a 0.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Como se muestra en la Tabla 22, una concentración de 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Ab permitió la preparación de biosensores más sensibles y con buena reproducibilidad en las medidas ( $\text{RSD} \leq 15\%$ ). Menores concentraciones de Ab (0.05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) propocionan una respuesta muy baja, disminuyendo la reproducibilidad en las medidas.

La Figura 63 muestra la curva de calibrado obtenida empleando las condiciones de ensayo optimizadas. El biosensor desarrollado presenta un valor de  $\text{IC}_{50}$  y límite de

**Tabla 22.** Parámetros de ajuste de los datos experimentales obtenidos para diferentes concentraciones de Ab MC10E7 ( $n = 9$ ).

Parámetro <sup>(a)</sup>	Concentración MC10E7, $\mu\text{g mL}^{-1}$		
	0.1	0.2	0.3
Límite de detección, $\text{ng L}^{-1}$	$0.007 \pm 0.001$	$2.4 \pm 0.9$	$13 \pm 2$
$\text{IC}_{50}$ , $\text{ng L}^{-1}$	$4.4 \pm 0.7$	$110 \pm 20$	$270 \pm 20$
Intervalo dinámico, $\text{ng L}^{-1}$	0.09 – 140	10 – 910	35 – 2500

<sup>(a)</sup>  $\pm \text{ts}/\sqrt{n}$ ,  $t_{95\%}$ .



**Figura 63.** Curva de calibrado (las barras de error muestran la desviación estandar para el valor medio de la respuesta de tres superficies sensoras, 3 réplicas por chip,  $n = 9$ ).

detección de  $(4.4 \pm 0.7) \text{ ng L}^{-1}$  ( $n = 9$ ) y  $(0.007 \pm 0.001) \text{ ng L}^{-1}$  ( $n = 9$ ), respectivamente, con un DR de 0.09 a  $136.56 \text{ ng L}^{-1}$ .

La respuesta en las distintas áreas sensoras de la guía de onda presenta una buena reproducibilidad, con valores de RSDs del 5 al 15%, en el intervalo dinámico, dependiendo de la concentración de MCLR. La reproducibilidad entre micromatrices ( $n = 3$  guías de onda) fue, en todos los casos  $\leq 23\%$  (RSD media en el intervalo dinámico del 16 %), comparable a valores descritos en bibliografía para inmunoensayos basados en el mismo principio de medida.

La superficie sensora se regeneró empleando una disolución de NaOH 50 mM. Se evaluó la estabilidad del biosensor, midiendo la respuesta, en ausencia de MCLR, tras sucesivas etapas de regeneración, en los 10 días posteriores a la funcionalización de la guía de onda. No se observaron diferencias significativas en la respuesta de la micromatriz de biosensores durante, al menos 10 ciclos de ensayo-regeneración.

El biosensor desarrollado, como se discutió en los capítulos 5.2.2.1 y 5.2.2.2, se puede utilizar para el análisis de MCs que contienen el aminoácido arginina en posición 4, con una reactividad cruzada del 92%, 98% and 88%, para MCRR, dm-MCRR y MCYR, respectivamente.

Los resultados descritos en este capítulo demuestran la utilidad de los conjugados BTL2-dextrano- $\text{NH}_2$ , sintetizados por primera vez en la bibliografía, para la preparación de monocapas de elementos de bioreconocimiento homogéneas y altamente ordenadas sobre guías de onda planas. Estas quimeras permiten la funcionalización de la superficie con haptenos de bajo peso molecular, sin que ello

**Tabla 23.** Figuras de mérito de los sensores, selectivos a MCs, desarrollados en la presente Tesis.

	Biosensor SPR <sup>(a)</sup>	Micromatriz de biosensores	
		Funcionalización (2D) via triamino-APMS-MCLR <sup>(a)</sup>	Funcionalización (pseudo-3D) via BTL2-dextrano (6 kDa)-MCLR <sup>(a)</sup>
LOD, ng L <sup>-1</sup>	73 ± 8	16 ± 3	0.007 ± 0.001
IC <sub>50</sub> , ng L <sup>-1</sup>	670 ± 90	340 ± 10	4.4 ± 0.7
DR, ng L <sup>-1</sup>	200 – 2000	60 – 1500	0.09 – 140

<sup>(a)</sup> ±ts/√n, t<sub>95%</sub>. LOD: límite de detección; IC<sub>50</sub>: concentración en el punto de inflexión; DR: intervalo dinámico.

afecte la estabilidad de la monocapa, facilitando el desarrollo de micromatrices de biosensores para la determinación de muy diversos analitos.

La aplicación de las quimeras sintetizadas a partir de dextranos con un peso molecular ≥6 kDa permite la preparación de fases sensoras tridimensionales, mas sensibles y con un mayor intervalo dinámico de respuesta al analito que cuando se emplean dextranos de peso molecular inferior.

Como se muestra en la Tabla 23, el empleo de los conjugados de BTL2-dextrano para la inmovilización de la MCLR permitió mejorar significativamente de la sensibilidad de la micromatriz de biosensores descrita en el apartado 5.2.2.2 del presente trabajo de Tesis, permitiendo la detección de MCLR a niveles de concentración de pg L<sup>-1</sup>.

### 5.3. Desarrollo de plataformas biosensoras multianalito para la determinación simultanea de triazinas, fluoroquinolonas y microcistinas en aguas superficiales.

El control de la calidad de las aguas requiere el análisis de un elevado número de muestras, así como la determinación de más de un compuesto en la misma muestra. Adicionalmente, es deseable que la monitorización se realice *in situ*, con el fin de reducir los costes asociados su transporte y almacenaje y agilizar la toma de decisiones por parte de los agentes responsables.

El objetivo final de la presente Tesis era el desarrollo de micromatrices de biosensores (*microarrays* o *biochips*) que permitiesen el análisis simultáneo de antibióticos (FQs),



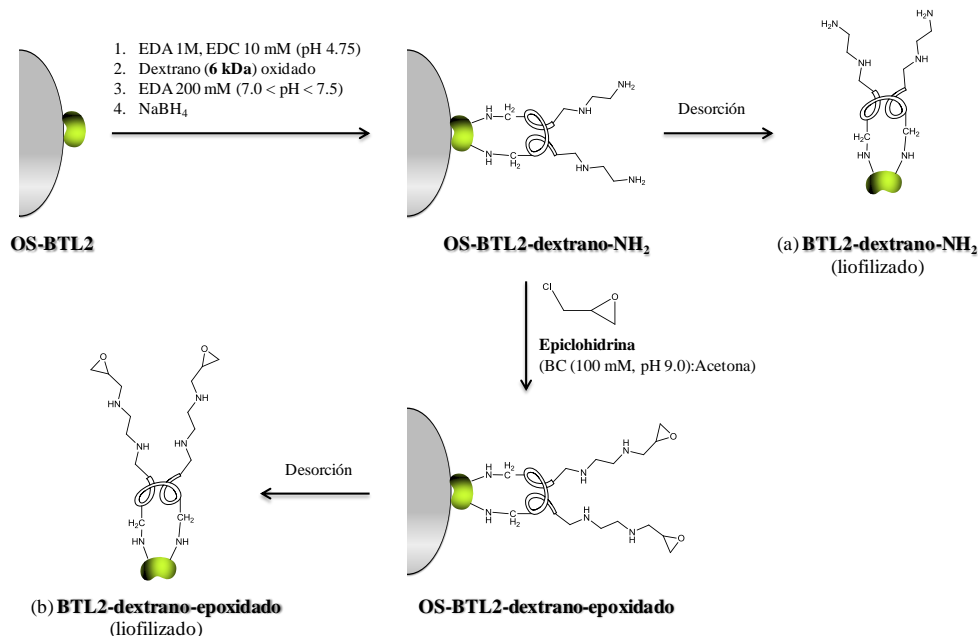
herbicidas (TRZs) y toxinas naturales (MCs) en aguas, empleando la metodología optimizada a lo largo del trabajo de Tesis. La disponibilidad de *microarrays* portátiles que faciliten la multidetección *in situ* de los analitos de interés en varias muestras de forma simultánea ha supuesto un reto importante para los investigadores en los últimos años [589]. Para el desarrollo de la micromatriz se ha empleado el equipo portátil Leopard Array Biosensor™ HLAB-2002, descrito la Introducción (sección 2.1.2.2), basado en medidas de fluorescencia por onda evanescente. La guía de onda se funcionalizó con los derivados hapténicos, de los analitos seleccionados, conjugados a la lipasa BTL2, modificada con dextrano. Como se demostró anteriormente (sección 5.2.2.3), el empleo de dichas quimeras, aproximación descrita por primera vez en este trabajo, permite mejorar de forma significativa la sensibilidad de los inmunosensores desarrollados con el *microarray*.

Se han evaluado dos procedimientos de derivatización diferentes. En una primera aproximación, la funcionalización de la guía de onda se llevó a cabo en dos etapas (secciones 5.2.2.3): 1) inmovilización de los derivados BTL2-dextrano sobre la guía y, 2) derivatización de dichos conjugados uniendo covalentemente, sobre la red de dextrano, los distintos derivados hapténicos correspondientes a los analitos de interés. Alternativamente, se llevó a cabo la síntesis en fase sólida de los conjugados BTL2-dextrano-hapteno, inmovilizando la BTL2, a través de la zona del centro activo, en un soporte comercial de OS. Tras su desorción del soporte, estos conjugados hapténicos se inmovilizaron sobre la guía de onda silanizada, al igual que en el primer caso, reduciendo su funcionalización a una única etapa.

### 5.3.1. Funcionalización de la guía de onda en dos etapas.

Se sintetizaron derivados BTL2-dextrano (6 kDa), funcionalizados con grupos amino primario (BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub>) o con grupos epóxido (BTL2-dextrano-epoxidado). La síntesis, como se ha indicado anteriormente, se llevó a cabo en fase sólida, con el fin de proteger el centro activo de la lipasa a través del cual se produce, posteriormente, la inmovilización sobre la superficie del vidrio silanizado (guía de onda).

El derivado BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> se sintetizó siguiendo el procedimiento anteriormente descrito (sección 5.2.2.3, Figura 55). Para la síntesis del derivado BTL2-dextrano-epoxidado se resuspendieron 2 g de OS-BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> en una disolución de 32 mL de BC (100 mM, pH 9.0) y 8.3 mL de acetona, sobre la que previamente se adicionaron 8 mL de epiclorhidrina, empleando un baño de hielo para evitar el calentamiento de la mezcla (Figura 64). Esta suspensión se agitó, suavemente,



**Figura 64.** Síntesis de derivados BTL2-dextrano-(6 kDa) con distintas funcionalidades: (a) BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> y (b) BTL2-dextrano-epoxidado.

durante 16 h, se lavó con agua para eliminar el exceso de epiclorhidrina, y el soporte (OS-BTL2-dextrano-epoxidado) se secó a vacío. Por último, el conjugado se desorbió del soporte de OS empleando una disolución de monolaurato de sucrosa (1 - 2%, v/v) en PB 5 mM a pH 7.0. Una vez eliminado el surfactante [590], el conjugados se liofilizó y se almacenó a -20 °C hasta su uso, momento en el que se redisolvió en PBS.

Para el desarrollo de la micromatriz de biosensores, la guía de onda silaniada con HMDS se funcionalizó en dos etapas: 1) inmovilización de los derivados BTL2-dextrano sobre la superficie del vidrio mediante interacciones hidrofóbicas y, 2) unión covalente del hapteno a través de los grupos amino o epóxido de la red de dextrano de la quimera.

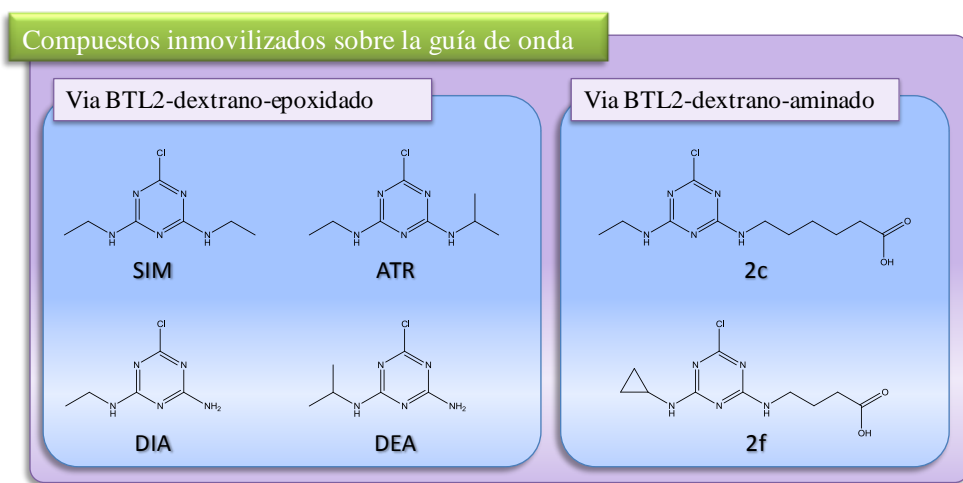
Los *microarrays* resultantes se aplicaron a la determinación simultánea de herbicidas TRZs, antibióticos FQs y/o toxinas naturales MCs (sección 5.2.2.3), empleando inmunoensayos de tipo competitivo. Con este fin, inicialmente se optimizaron los parámetros de ensayo para cada uno de los analitos de interés, de forma independiente.

### 5.3.1.1. Optimización del *microarray* para la determinación de triazinas.

Para el desarrollo de la micromatriz de sensores selectiva a TRZs se utilizó el antisuero As8, seleccionado anteriormente para el desarrollo de un biosensor en flujo basado en un inmunoensayo enzimático de tipo competitivo y detección fluorescente (sección 5.2.1).

Se sintetizaron seis conjugados de tapizado BTL2-dextrano-hapteno a partir de los derivados comerciales mostrados en la Figura 65, *i.e.*, SIM, ATR y dos de sus productos de degradación (DEA y DIA), así como de dos derivados sintéticos de la simazina (2c y 2f).

La elección de estos compuestos se realizó teniendo en cuenta la reactividad del antisuero As8, caracterizada en la sección 5.2.1. A partir de los resultados de dicho estudio se cabría esperar que la funcionalización de la guía de onda con el conjugado BTL2-dextrano-2c originara una señal de fluorescencia elevada en ausencia de TRZs ( $B_0$ ), dado que el inmunógeno seleccionado para la obtención del antisuero se sintetizó empleando el hapteno 2c. Del mismo modo, cabría esperar una respuesta instrumental elevada empleando conjugados de tapizado derivatizados con SIM, o ATR, dado que el antisuero presenta elevada reactividad cruzada frente a dichas TRZs (Figura 38). Por otro lado, la afinidad del antisuero As8 frente a los compuestos 2f, DIA y DEA es



**Figura 65.** Estructura química de los compuestos conjugados a derivados BTL2-dextrano, para la funcionalización de la guía de onda, durante la optimización de la matriz de sensores selectivos a TRZs.

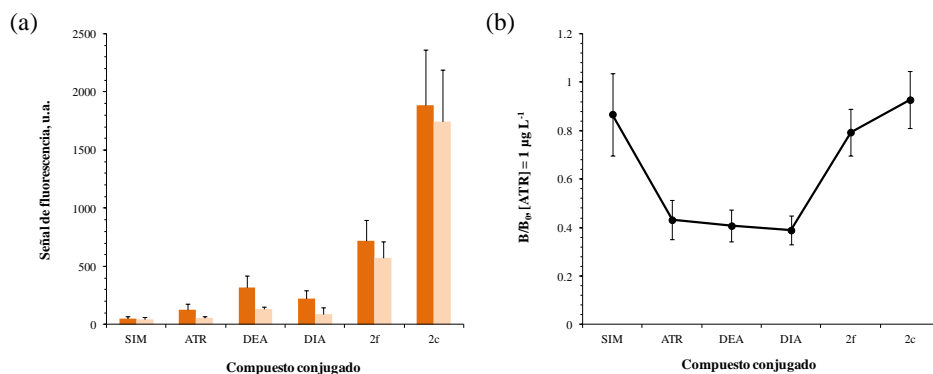
menor que para el resto. No obstante, dichos derivados hapténicos también se incluyeron en el estudio ya que la sensibilidad del inmunoensayo depende tanto de la estabilidad de los complejos Ab-TRZ<sub>libre</sub>, como de la de los complejos Ab-conjugado de tapizado, y una menor afinidad por el conjugado de tapizado podría desplazar el equilibrio hacia la formación de los complejos Ab-TRZ<sub>libre</sub>, incrementando la sensibilidad del ensayo.

Los compuestos comerciales SIM, ATR, DEA y DIA se conjugaron covalentemente a derivados BTL2-dextrano-epoxidado, mediante el ataque nucleófilo de los grupos amino, presentes en la estructura química de dichos compuestos, al anillo de epóxido. Para ello, tras la inmovilización del conjugado, BTL2-dextrano-epoxidado, sobre la guía de onda silanizada, ésta se incubó con una disolución del hapteno ( $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en BC (100 mM, pH 12) durante 16 horas. La inmovilización de los derivados 2c y 2f se llevó a cabo *via* carbodiimida, incubando la superficie previamente tapizada con BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub>, con una disolución del hapteno ( $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en tampón MES 50 mM, a pH 6.0, en presencia de EDC 100 mM y NHS 50 mM.

Adicionalmente se evaluó la interacción inespecífica del antisuero As8 con los derivados de BTL2, empleando como control negativo microcanales tapizados con derivados BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> y BTL2-dextrano-epoxidado tratados con los reactivos derivatizantes (EDC/NHS en MES o BC), en ausencia de los derivados hapténicos. Como control positivo, se empleó una superficie funcionalizada con el conjugado BTL2-dextrano-biotina, obtenida según se describió anteriormente (sección 5.2.2.3., Figura 57). Previo al inmunoensayo, los chips funcionalizados se bloquearon durante 90 min empleando una disolución de leche desnatada en polvo al 3% (*p/v*) en PBST.

No se observó respuesta en ninguno de los controles negativos evaluados, lo que confirma que el antisuero As8 no se une inespecíficamente sobre los derivados BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> y BTL2-dextrano-epoxidado.

Los conjugados de DEA y DIA con BTL2-dextrano-epoxidado originaron mayores intensidades de fluorescencia, en ausencia de TRZs ( $B_0$ ), que los obtenidos por conjugación con TRZs SIM y ATR, según se observa en la Figura 62.a. Dado que la reactividad del antisuero As8 es mayor frente a TRZs que para los productos de degradación, la mayor intensidad de fluorescencia observada para los derivados de DEA y DIA se atribuyó a un mayor rendimiento de conjugación, debido a la presencia, en dichos compuestos, de grupos amino primario más reactivos. Desafortunadamente, no ha sido posible confirmar experimentalmente de este dato. Por otra parte, la limitada solubilidad de las TRZs en medio acuoso impidió trabajar a concentraciones superiores de este compuesto para favorecer el rendimiento de conjugación.



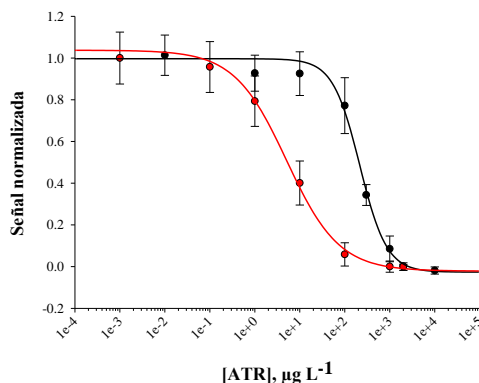
**Figura 66.** Efecto de la naturaleza del compuesto unido covalentemente a los derivados BTL2-dextrano sobre la respuesta del biosensor. SIM: simazina; ATR: atrazina; DEA: desetil-atrazina; DIA: desisopropil-atrazina; 2c y 2f: derivados de simazina. (a) Intensidad de fluorescencia en: (■) ausencia y, (□) presencia de ATR,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . (b) Sensibilidad del biosensor, en términos de  $B/B_0$ . Disolución portadora: PBSTM, pH 7.4;  $[\text{As8}] = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $[\text{Cy5-Abs}] = 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; tiempo de incubación  $\text{As8} + \text{Ab anti-biotina} + \text{muestra}$ , 20 min; tiempo de revelado, 20 min ( $n = 3$ ).

Aunque la sensibilidad del ensayo fue mayor (menor valor  $B/B_0$ ) al emplear como conjugados de tapizado los derivados de ATR, DEA y DIA (Figura 66.b), la respuesta instrumental obtenida en estos casos se consideró demasiado baja (Figura 66.a), por lo que se decidió continuar la caracterización del inmunosensor empleando los haptenos 2f y 2c como conjugados de tapizado.

En la Figura 67 se muestran las curvas de calibrado obtenidas en los ensayos competitivos realizados con ambos haptenos en presencia de concentraciones crecientes de ATR, en el intervalo de 0 a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , para una concentración de antisuero As8  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

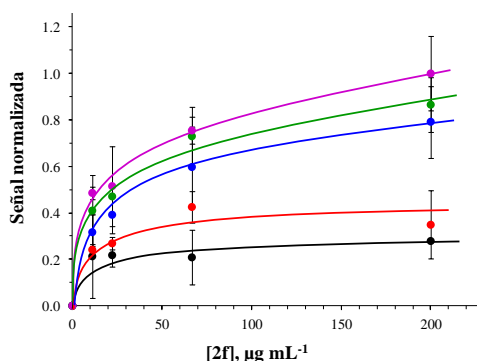
La mayor intensidad de fluorescencia en ausencia de analito se obtuvo funcionalizando la guía de onda con el conjugado BTL2-dextrano-2c (Figura 66.a). Sin embargo, el inmunosensor mas sensible a ATR (menor valor de  $\text{IC}_{50}$ ) se obtuvo empleando BTL2-dextrano-2f ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) para el tapizado de las guías de onda en lugar del hapteno 2c ( $215 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Este resultado está de acuerdo con los datos obtenidos con el inmunosensor enzimático descrito en la sección 5.2.1. Por todo ello, se seleccionó el derivado BTL2-dextrano-2f como conjugado de tapizado para la funcionalización de la guía de onda.

A continuación se estudió el efecto de la **concentración de 2f** en la disolución de tapizado, en el intervalo de 5 a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , y de la concentración de antisuero As8 ( $3 - 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) sobre la sensibilidad del biosensor.

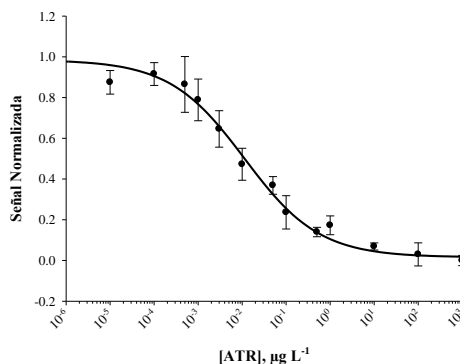


**Figura 67.** Respuesta del sensor empleando: (•) BTL2-dextrano-2c o (•) BTL2-dextrano-2f como conjugados de tapizado. Concentración de hapteno ( $2c/2f$ ) =  $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; disolución portadora durante la conjugación del hapteno, MES 50 mM, pH 6.0; [EDC] = 100 mM; [NHS] = 50 mM; disolución portadora durante el ensayo: PBSTM; [As8] =  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  (incubación, 20 min); [Ab anti-biotina] =  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; [DyLight-649-Abs] =  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (incubación, 20 min), ( $n = 5$ ).

Como se observa en la Figura 68, la intensidad de fluorescencia en ausencia de TRZs ( $B_0$ ) aumenta con la concentración de hapteno y antisuero As8, seleccionándose como concentraciones óptimas,  $65 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. En estas condiciones se asegura una adecuada respuesta instrumental, al tiempo que se trabaja en defecto de Ab, lo que incrementará la sensibilidad del ensayo.



**Figura 68.** Efecto de la concentración de 2f en la disolución de funcionalización de la guía de onda, sobre la respuesta del sensor en ausencia de analito ( $B_0$ ). Disolución portadora durante la etapa de funcionalización, tampón MES 50 mM, pH 6.0; [EDC] = 100 mM; [NHS] = 50 mM; disolución portadora durante el ensayo: PBSTM; Concentración de As8: (•) 3, (•) 7, (•) 20, (•) 30 y (•)  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  (tiempo de incubación, 20 min); [DyLight-649-Ab] =  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (incubación, 20 min), ( $n = 3$ ).



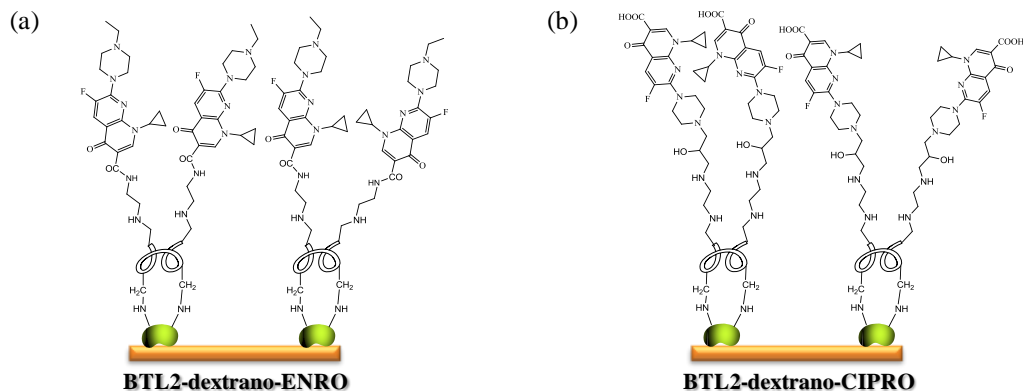
**Figura 69.** Curva de respuesta de la matriz de sensores para la determinación de ATR. Funcionalización de la guía de onda en dos etapas: 1) BTL2-dextrano- $\text{NH}_2$  ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ , 30 min), 2) 2f ( $65 \mu\text{g mL}^{-1}$  en tampón MES 50 mM, pH 6.0; [EDC] = 100 mM; [NHS] = 50 mM). Disolución portadora durante el ensayo: PBSTM; [As8] =  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; [Ab anti-biotina] =  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; [DyLight-649-Ab] =  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Etapas de incubación y revelado, 20 min; (las barras de error corresponden a la desviación estándar para la media de 3 guías de onda y 5 réplicas por guía,  $n = 15$ ).

Por último, se evaluó la respuesta de la matriz de biosensores frente a concentraciones crecientes de ATR en la muestra en el intervalo de  $0.00001 - 1000 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 69) obteniéndose un  $\text{IC}_{50}$   $18 \pm 4 \text{ ng L}^{-1}$  y un LOD de  $0.09 \pm 0.05 \text{ ng L}^{-1}$ , con un DR de 0.6 a  $230 \text{ ng L}^{-1}$  (3 guías de onda y 5 réplicas por guía,  $n = 15$ ). La sensibilidad del ensayo es mucho mayor que la obtenida para el inmunosensor en flujo descrito en la sección 5.2.1, el cual presentó un LOD de 1.3 y  $2 \text{ ng L}^{-1}$ , para SIM y ATR respectivamente.

### 5.3.1.2. Optimización del *microarray* para la determinación de fluoroquinolonas.

Para el desarrollo de la matriz de biosensores selectivos a FQs se sintetizaron dos conjugados de tapizado, uniendo covalentemente el antibiótico ENRO, o su metabolito CIPRO, al conjugado BTL2-dextrano. La inmovilización de ENRO se llevó a cabo sobre una superficie funcionalizada con BTL2-dextrano- $\text{NH}_2$ , *via* carbodiimida, Figura 70.a, a través del grupo ácido carboxílico presente en la estructura del antibiótico. El antibiótico CIPRO se conjugó a BTL2-dextrano-epoxidado, a través del grupo piperazina presente en su estructura, según se muestra en la Figura 70.b.

Tras la funcionalización de la guía de onda, se llevó a cabo un inmunoensayo, en ausencia de FQs, con el fin de evaluar la interacción de dos anticuerpos monoclonales selectivos a FQs con ambos conjugados (BTL2-dextrano-ENRO y BTL2-dextrano-CIPRO), *i.e.* el MAb anti-FQs MAb17401, disponible comercialmente (QED Bioscience Inc.) y, el MAb anti-FQs FQ8G13A, producido por el grupo AMRG-



**Figura 70.** Superficies sensoras evaluadas para el desarrollo de la matriz de biosensores selectivos a FQs. (a) Inmovilización de ENRO sobre una superficie tapizada con BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub>, *via* carbodiimida; (b) inmovilización de CIPRO sobre una superficie tapizada con BTL2-dextrano-epoxidado, a través del grupo piperazina presente en su estructura.

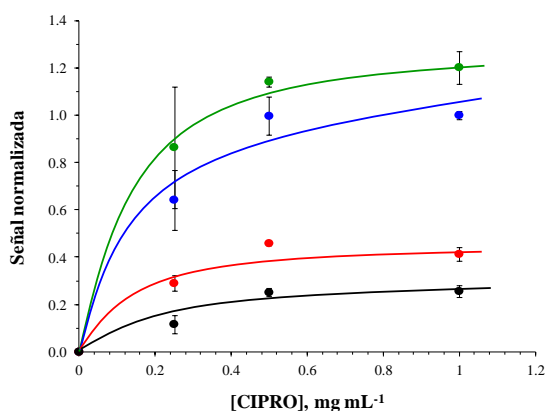
IQAC, dirigido por la Prof. Marco. El anticuerpo comercial se obtuvo a partir de ratones inmunizados con el conjugado KLH-ENRO, obtenido por conjugación del antibiótico a la proteína *via* carbodiimida, por lo que cabría esperar una buena reactividad cruzada frente al conjugado BTL2-dextrano-ENRO. En relación al MAb anti-FQs FQ8G13A, no ha sido posible disponer del procedimiento detallado de su preparación, ya que estaba en proceso de licencia con fines comerciales. No obstante, de acuerdo a la información proporcionada por la Prof. Marco, el grupo ácido carboxílico característico de las FQs no se ve implicado en la síntesis del inmunógeno, por lo que cabría esperar una buena reactividad cruzada frente al conjugado BTL2-dextrano-CIPRO.

El Ab comercial MAb17401 no mostró reactividad cruzada frente a ninguno de los dos conjugados sintetizados.

En relación al MAb FQ8G13A, solo se observó reactividad frente a la superficie funcionalizada con BTL2-dextrano-CIPRO, por lo que dicho derivado se seleccionó como conjugado de funcionalización de la guía de onda para el desarrollo del *microarray*.

Una vez seleccionada la pareja Ab/conjugado de tapizado para el desarrollo del biosensor se evaluó el efecto del pH del medio (BC 100 mM) sobre la eficiencia de la derivatización del BTL2-dextrano-epoxidado, inmovilizado en la guía de onda, con el antibiótico CIPRO, en el intervalo de 10 - 12. Se observó un incremento de la





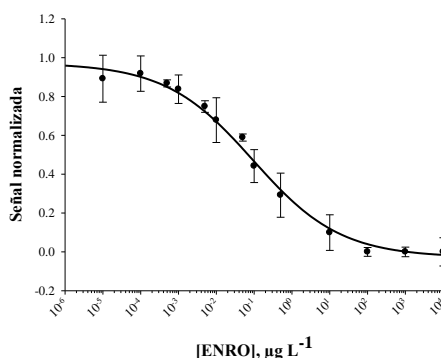
**Figura 71.** Efecto de la concentración de CIPRO en la disolución de funcionalización de la guía de onda, sobre la respuesta del sensor en ausencia de analito ( $B_0$ ). Disolución portadora durante la etapa de funcionalización, BC 100 mM, pH 12; disolución portadora durante el ensayo: PBSTM. Concentración de FQ8G13A: (•) 1.25, (•) 2.5, (•) 5 y (•) 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (incubación, 20 min); [DyLight-649-Ab] = 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (incubación, 20 min), ( $n = 3$ ).

intensidad de fluorescencia máxima del biosensor ( $B_0$ ) al aumentar la basicidad del medio, seleccionándose un valor de pH 12 para posteriores ensayos.

A continuación se estudió el efecto de la concentración de CIPRO para la derivatización del BTL2-dextrano-epoxidado, en el intervalo de 0.25 a 1  $\text{mg mL}^{-1}$ , y de la concentración del Ab FQ8G13A (1.25 - 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) sobre la sensibilidad del biosensor.

Como se muestra en la Figura 71, la intensidad de fluorescencia en ausencia de FQs ( $B_0$ ) aumenta con la concentración de CIPRO empleada durante la etapa de funcionalización, así como con la concentración de Ab empleada en el inmunoensayo, seleccionándose como concentraciones óptimas de CIPRO y FQ8G13A, 0.5  $\text{mg mL}^{-1}$  y 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. En estas condiciones, el biosensor presenta una intensidad de respuesta adecuada, al tiempo que se trabaja en defecto de Ab.

Por último, se evaluó la respuesta de la matriz de sensores frente a concentraciones crecientes de ENRO (Figura 72), obteniéndose un valor de  $\text{IC}_{50}$  y un LOD de  $75 \pm 9$  y  $0.11 \pm 0.04$   $\text{ng L}^{-1}$ , respectivamente (3 guías de onda, 5 réplicas por guía,  $n = 15$ ), con un DR de 2.2 a 1600  $\text{ng L}^{-1}$ .



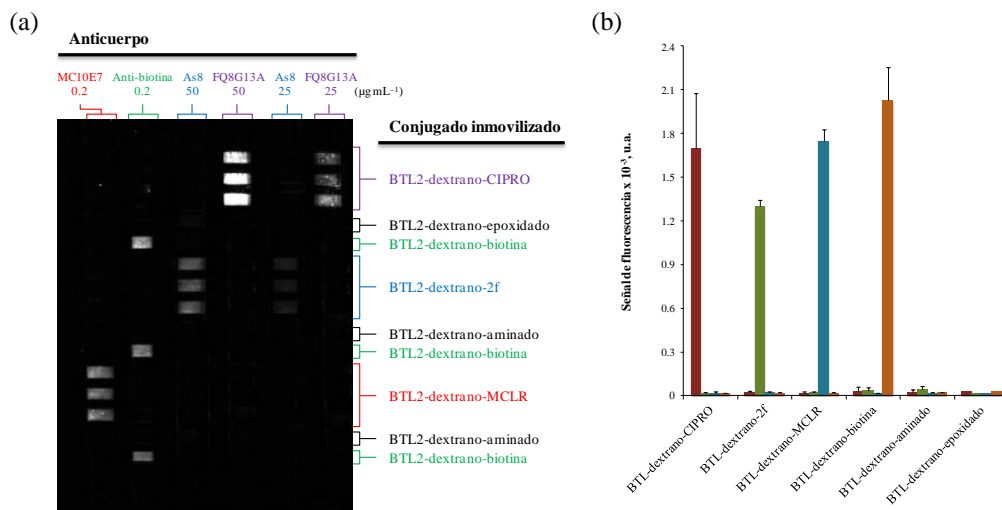
**Figura 72.** Curva de respuesta de la matriz de biosensores para la determinación de ENRO. Funcionalización de la guía de onda en dos etapas: 1) BTL2-dextrano-epoxidado ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ , 30 min), 2) CIPRO ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  en BC 100 mM, pH 12.0). Disolución portadora durante el ensayo: PBSTM; [FQ8G13A] =  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; [Ab anti-biotina] =  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; [DyLight-649-Ab] =  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Etapas de incubación y revelado, 20 min; (3 guías de onda, 5 réplicas por guía,  $n = 15$ ).

### 5.3.1.3. Análisis multianálito.

Cuando se lleva a cabo un ensayo multianálito, es necesario asegurarse de que los bioreceptores seleccionados para cada una de las familias de contaminantes son selectivos a dicha familia, *i.e.* que cada uno de los conjugados inmovilizados solo es reconocido por su correspondiente anticuerpo. Si alguno de los conjugados hapténicos fuera reconocido por más de un Ab, debería descartarse para la preparación del *microarray*.

Así, con el objetivo de evaluar la especificidad de la respuesta, la guía de onda se funcionalizó en diferentes secciones, con los conjugados BTL2-dextrano-MCLR, BTL2-dextrano-CIPRO y BTL2-dextrano-2f. Adicionalmente se inmovilizó el conjugado BTL2-dextrano-biotina como control positivo, y los derivados BTL2-dextrano- $\text{NH}_2$  y BTL2-dextrano-epoxidado como controles negativos. Seguidamente, se evaluó la respuesta individual de cada Ab (MC10E7, As8, FQ8G13A y Ab anti-biotina), frente a cada uno de los conjugados inmovilizados.

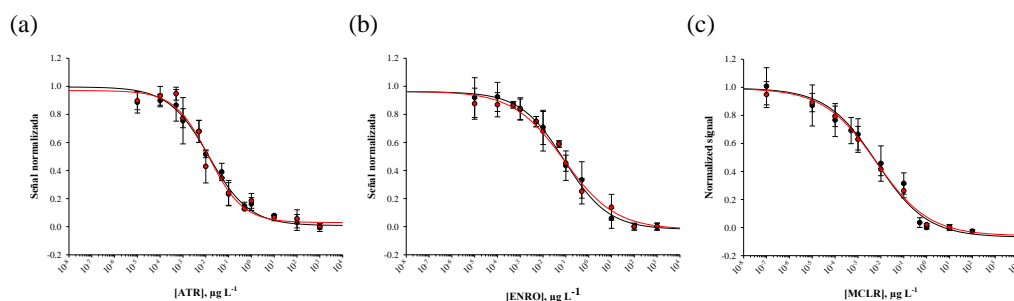
Como puede observarse en la Figura 73, la respuesta de los Abs es específica, obteniéndose una señal fluorescente únicamente en la sección de la guía de onda funcionalizada con su correspondiente conjugado hapténico. Así, el Ab anti-FQs (FQ8G13A) se inmoviliza únicamente en la sección funcionalizada con BTL2-dextrano-CIPRO; el antisuero selectivo a TRZs (As8) reconoce específicamente al conjugado BTL2-dextrano-2f; el Ab anti-MCs (MC10E7) solo muestra reactividad



**Figura 73.** (a) Imagen de fluorescencia obtenida con el *microarray* de antígenos incubado con distintos anticuerpos. Los conjugados inmovilizados y su localización se indican a la derecha de la imagen. El anticuerpo adicionado a la muestra y su concentración está indicado en la parte superior. (b) Intensidad de fluorescencia obtenida tras la interacción de los anticuerpos (■) anti-FQs (FQ8G13A, 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), (■) anti-TRZs (As8, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), (■) anti-MCs (MC10E7, 0.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y (■) anti-biotina (0.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) con los distintos conjugados inmovilizados sobre la guía de onda. Disolución portadora durante el ensayo: PBSTM. [DyLight-649-Abs] = 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Etapas de incubación y revelado, 20 min.

frente al conjugado BTL2-dextrano-MCLR y, el Ab anti-biotina reconoce específicamente al conjugado BTL2-dextrano-biotina. La respuesta observada frente a otros conjugados hapténicos no presenta diferencias significativas con la medida en las secciones funcionalizadas con los derivados BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> y BTL2-dextrano-epoxidado (controles negativos) y fue, en todos los casos, del mismo orden que la señal de fondo (intensidad de fluorescencia en las secciones sin funcionalizar con los derivados de BTL2, *i.e.* vidrio derivatizado con HMDS), presentando, en todos los casos, una intensidad de respuesta < 2% de la señal asociada a un reconocimiento específico (B<sub>0</sub>).

Posteriormente se evaluó la respuesta del biosensor multianalito frente a muestras patrón preparadas con concentraciones crecientes de ENRO (10<sup>-5</sup> – 103  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), ATR (10<sup>-5</sup> – 103  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) y MCLR (10<sup>-7</sup> – 102  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Para ello, se adicionó a las muestras patrón, una mezcla de anticuerpos (MAb anti-MCs, MC10E7; PAb anti-TRZ, As8; MAb anti-FQs, FQ8G13A; y MAb anti-biotina como control positivo), a una concentración final de cada uno de ellos equivalente a la optimizada durante los



**Figura 74.** Curva de respuesta de la micromatriz de sensores para la determinación de: (a) ATR, (b) ENRO y, (c) MCLR. (●) Inmunoensayo individual; (●) Micromatriz multianalito. Funcionalización de la guía de onda en dos etapas. Disolución portadora durante el ensayo: PBSTM; [As8] = 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [FQ8G13A] = 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [MC10E7] = 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [Ab anti-biotina] = 0.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [DyLight-649-Abs] = 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Etapas de incubación y revelado, 20 min; (Inmunoensayo individual,  $n = 9$ ; Inmunoensayo multianalito,  $n = 3$ ).

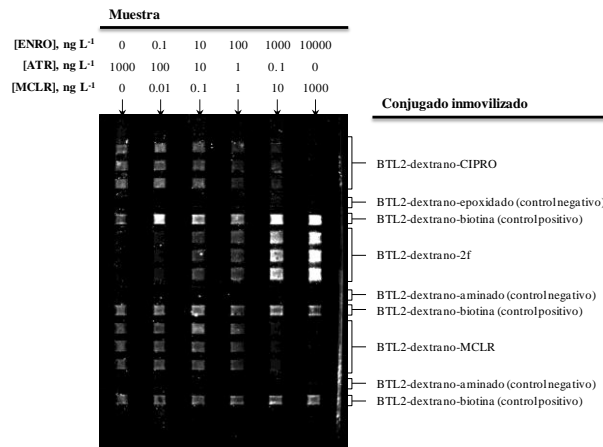
ensayos individuales (secciones 5.2.2.2., 5.3.1.1 y 5.3.1.2.). La respuesta del microarray multianalito, para cada uno de los contaminantes evaluados, no presentó diferencias significativas con respecto a la respuesta obtenida al emplear el *microarray* para la determinación de un solo analito (ensayo individual), independientemente de que la muestra analizada presentara un único contaminante o una combinación de varios de ellos (Figura 74).

La Figura 75 muestra una imagen obtenida con el microarray multianalito en presencia de disoluciones patrón conteniendo ENRO, ATR y MCLR, en el intervalo de concentraciones de 0 – 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

La reproducibilidad de la respuesta normalizada entre canales, fue buena para este tipo de dispositivos, con una RSD < 15% en todos los casos. La reproducibilidad entre distintas superficies sensoras, o guías de onda, fue del 9 – 25%, dependiendo del contaminante y su concentración en la muestra ( $n = 3$ ).

Las figuras de mérito de la micromatriz de biosensores multianalito desarrollada para el análisis simultáneo de FQs, TRZs y MCs están recogidas en la Tabla 24.

Adicionalmente, se evaluó la posible existencia de efecto matriz, calibrando la respuesta del *microarray* frente a muestras de agua potable (agua de grifo) libres de contaminantes, a un nivel de concentración inferior al LOD del método. No se observaron diferencias significativas (nivel de confianza del 95%) con los calibrados obtenidos en PBSMT, por lo que la cuantificación de los contaminantes puede realizarse directamente empleando calibrados externos en disolución reguladora. La matriz de sensores se aplicó con éxito



**Figura 75.** Imagen de fluorescencia obtenida con el *microarray* de antígenos en presencia de disoluciones patrón conteniendo ENRO, ATR y MCLR, en el intervalo de concentraciones de 0 – 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Funcionalización de la guía de onda en dos etapas. Los conjugados inmovilizados y su localización se indican a la derecha de la imagen. La composición de las disoluciones patrón aparece en la parte superior de la misma. Disolución portadora durante el ensayo: PBSTM; [As8] = 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [FQ8G13A] = 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [MC10E7] = 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [Ab anti-biotina] = 0.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [DyLight-649-Abs] = 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Etapas de incubación y revelado, 20 min.

al análisis simultáneo de MCLR, ENRO y ATR en muestras de agua potable, enriquecidas con los contaminantes a distintos niveles de concentración. Los resultados obtenidos (Tabla 25) permiten concluir que el biosensor desarrollado es una herramienta muy útil para el análisis simultáneo del contenido de estos compuestos en muestras de agua, presentando una elevada selectividad y bajos LOD.

**Tabla 24.** Figuras de mérito para la *micromatriz* de biosensores multianálito para la determinación simultánea de FQs, TRZs y MCs. Funcionalización de la guía de onda en dos etapas.

Parámetro	Conjugado de tapizado (Anticuerpo)		
	BTL2-dextrano-CIPRO (MAB FQ8G13A)	BTL2-dextrano-2f (As8)	BTL2-dextrano-MCLR (MAB MC10E7)
Contaminante	ENRO	ATR	MCLR
LOD <sup>(a)</sup> , ng L <sup>-1</sup>	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.05	0.007 ± 0.001
IC <sub>50</sub> <sup>(a)</sup> , ng L <sup>-1</sup>	75 ± 9	18 ± 4	4.4 ± 0.7
DR <sup>(a)</sup> , ng L <sup>-1</sup>	2.2 – 1600	0.6 – 230	0.09 – 140

<sup>(a)</sup>  $\pm ts/\sqrt{n}$ ,  $t_{95\%}$ , (3 guías de onda, 5 réplicas por guía, n = 15).

**Tabla 25.** Análisis de muestras de agua de grifo empleando la matriz de biosensores para el análisis simultáneo de ENRO, ATR y MCLR (n = 6).

Muestra	Contaminante	Adicionado, ng L <sup>-1</sup>	Encontrado, ng L <sup>-1</sup> <sup>(a)</sup>	Recuperación, %
1	MCLR	0.1	0.13 ± 0.06	130
	ENRO	1000	1000 ± 300	100
	ATR	100	120 ± 50	120
2	MCLR	10	11 ± 3	110
	ENRO	100	110 ± 20	110
	ATR	10	12 ± 3	120
3	MCLR	100	80 ± 20	80
	ENRO	10	120 ± 8	120
	ATR	1	1.5 ± 0.8	150

<sup>(a)</sup>  $\pm ts/\sqrt{n}$ ,  $t_{95\%}$ .

La matriz de biosensores desarrollada presenta LODs comparables [525,538] o incluso inferiores a los descritos para otros inmunosensores selectivos a MCs [487,519,520, 526,528], FQs [532,534] y TRZs [536,539,544-546], con la ventaja de que permite la monitorización de las tres familias de contaminantes, en hasta 6 muestras distintas, de forma simultánea en un tiempo de 60 min.

### 5.3.2. Funcionalización de la guía de onda en una única etapa: síntesis y caracterización de conjugados BTL2-dextrano-2f, BTL2-dextrano-CIPRO y BTL2-dextrano-biotina.

Con el objetivo simplificar la etapa de funcionalización de la guía de onda, se llevó a cabo la preparación de los conjugados BTL2-dextrano-2f y BTL2-dextrano-CIPRO mediante síntesis en fase sólida. Tras la una etapa de purificación, los conjugados se inmovilizaron sobre la guía de onda, previamente derivatizada con HMDS. El empleo de este procedimiento permite reducir, significativamente, el tiempo de preparación del microarray (30 min) facilitando la inmovilización de distintos conjugados de forma sencilla y rápida, en función de las necesidades del análisis.

#### 5.3.2.1. Síntesis y caracterización de los conjugados.

La síntesis de los conjugados hapténicos se realizó en fase sólida, partiendo de derivados BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> y BTL2-dextrano-epoxidado inmovilizados sobre un

soporte comercial de octil-agarosa. Como se ha indicado en la sección 5.2.2.3., la modificación de la lipasa en fase sólida permite su funcionalización manteniendo intacta la zona del centro activo.

Así, la síntesis de conjugado BTL2-dextrano-2f se llevó a cabo suspendiendo 1 g de OS-BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> (~1.5 mg BTL2 por gramo de soporte) en 5.8 mL de una disolución de 2f 1.54 mM en DMSO/MES (50 mM, pH 6), (60:40, v/v). Seguidamente se adicionó EDC y NHS hasta alcanzar una concentración final de 51.3 y 25.7 mM, respetivamente, y la mezcla se dejó incubar 12 h con agitación suave. Posteriormente, la suspensión se filtró y el soporte (OS-BTL2-dextrano-2f) se lavó con agua destilada y se secó a vacío.

La síntesis de conjugado BTL2-dextrano-CIPRO se llevó a cabo a partir de BTL2-dextrano-epoxidado. Para ello, 2g de OS-BTL2-dextrano-epoxidado, preparado a partir de OS-BTL2 (~1.5 mg BTL2 por gramo de soporte), se suspendieron en 6 mL de una disolución de CIPRO 3 mM en BC (100 mM, pH 10). Tras 12 h de incubación con agitación suave, el soporte (OS-BTL2-dextrano-CIPRO) se filtró y se lavó con exceso de agua.

Adicionalmente se preparó un conjugado de biotina, para su utilización como control positivo. Como alternativa a la D-biotina, utilizada en el desarrollo del array descrito en la sección 5.3.1., en este caso se empleó un derivado de biotina, el trifluoroacetato de N-Biotinil-3,6,9-trioxaundecil-1,11-diamina (BL). Para la síntesis se suspendieron, 2 g de OS-BTL2-dextrano-epoxidado en 6 mL de una disolución 3 mM del derivado de biotina en BC (100 mM, pH 10). Tras 12 h con agitación, el soporte (OS-BTL2-dextrano-BL) se filtró y se lavó con exceso de agua.

A continuación, los productos OS-conjugado hapténico se resuspendieron en una disolución de monolaurato de sucrosa (1 - 2%, v/v) en PB 5 mM a pH 7.0, y se incubaron durante 1 h con agitación suave. El sobrenadante (conjugado disuelto) se filtró y el monolaurato de sucrosa se hidrolizó en presencia de la lipasa *Thermomyces lanuginosa* (TLL) previamente inmovilizada sobre glioxil-agarosa, eliminándose mediante diálisis [590]. Los conjugados se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso, momento en el que se redisolviéron en PBS.

La conjugación de los haptenos CIPRO y 2f se confirmó mediante la caracterización de las quimeras por Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (XPS), en colaboración con el Prof. J.L. García Fierro (Instituto de Catálisis y Petroleoquímica-CSIC), gran experto en esta técnica. Los espectros obtenidos para los conjugados liofilizados BTL2-dextrano-2f y BTL2-dextrano-CIPRO, se compararon con los de los conjugados BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> y BTL2-dextrano-epoxidado, respectivamente.

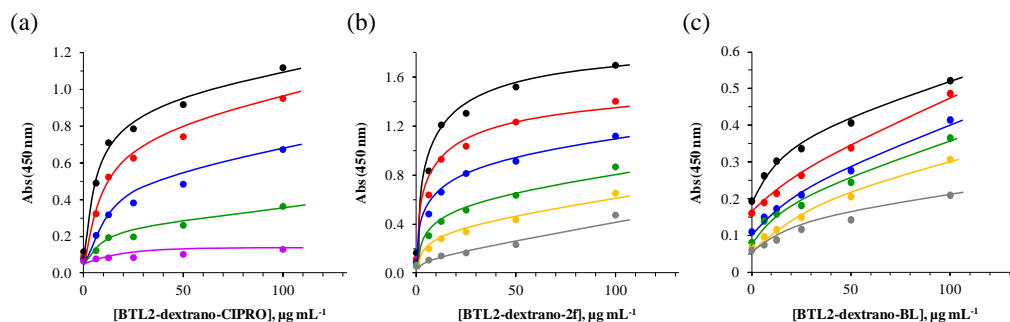
**Tabla 26.** Energías de enlace del C 1s, N 1s, O 1s, F 1s y Cl 2p obtenidas de los espectros XPS de alta resolución correspondientes a los conjugados hapténicos BTL2-dextrano-2f y BTL2-dextrano-CIPRO, y los derivados BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> y BTL2-dextrano-epoxidado.

Muestra	C 1s <sup>(a)</sup>	N 1s	O 1s	F 1s	Cl 2p
BTL2-dextrano-NH <sub>2</sub>	284.8 (58) 286.3 (33) 288.3 (9)	399.7	532.8	--	--
BTL2-dextrano-2f	284.8 (65) 286.3 (26) 288.2 (9)	399.7	532.7	--	<b>199.4</b>
BTL2-dextrano-epoxidado	284.8 (59) 286.3 (29) 288.1 (12)	399.9	532.7	--	--
BTL2-dextrano-CIPRO	284.8 (62) 286.4 (28) 288.2 (10)	399.6	532.8	<b>686.6</b>	--

<sup>a</sup>El pico correspondiente al C 1s mostró tres componentes: a 284.8 eV, asociado a los átomos de C participantes en enlaces C-C/C-H [591,592], a 286.3 eV asociado a enlaces C-O y C-N, y a 288.3 eV atribuido a especies C=O [591-595]. Entre paréntesis se indica el porcentaje atómico.

Los componentes y energías de enlace obtenidas de los espectros XPS de alta resolución se recogen en la Tabla 26. Si bien el espectro general XPS de los conjugados hapténicos está dominado por los picos característicos de la red de dextranos (*i.e.* picos C 1s ~284.8 eV, O 1s ~532.5 eV y emisión de Auger OKLL ~720 eV), el espectro de alta resolución reveló la presencia, en todos los conjugados, de N (N 1s ~399.9 eV), atribuido a los grupos amino presentes en la estructura proteica (*i.e.* >N-C, NH-C [596]). Así mismo, en el caso del conjugado BTL2-dextrano-CIPRO se observó la presencia de F (F 1s ~ 686.6 – 686.7 eV característico de átomos de F que participan en un enlace covalente F-C) presentes en la estructura de CIPRO [597,598]). En el caso del conjugado BTL2-dextrano-2f se confirmó la presencia de átomos de Cl (Cl 2p ~199.4 eV, doblete 2p<sub>3/2</sub> and 2p<sub>1/2</sub>, característico de átomos de Cl que participan en un enlace covalente Cl-C [599]) característicos de las TZRs. Por tanto se confirma la derivatización de los conjugados BTL2-dextrano con el antibiótico CIPRO y del derivado de SIM, respectivamente.





**Figura 76.** Ensayos de titulación (ELISA indirecto). Valoración de la interacción (a) MAb FQ8G13A - BTL2-dextrano-CIPRO, (b) As8 - BTL2-dextrano-2f y, (c) MAb anti-biotina - BTL2-dextrano-BL. Disolución de tapizado: BC 50 mM, pH 9.6 (1 h, 37 °C) Disolución portadora durante el ensayo: PBST, pH 7.4; Concentración de Ab (•) 0.78, (•) 1.25, (•) 3.12, (•) 6.25, (•) 12.5, (•) 25 y, (•) 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (30 min); HRP-Abs anti-IgG (167  $\text{ng mL}^{-1}$ , 30 min); sustratos enzimáticos: tetrametilbenzidina (TMB 0.6%,  $m/v$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1%,  $v/v$ ), (30 min).

Posteriormente se evaluó la interacción entre los conjugados hapténicos sintentizados y distintos anticuerpos mediante inmunoensayos, empleando un formato ELISA no competitivo, de conjugado hapténico inmovilizado. Así, la placa se tapizó con distintas concentraciones de BTL2-dextrano-hapteno y se incubó con el anticuerpo seleccionado empleando para el revelado un Ab secundario marcado con HPR (HRP-Ab anti-IgG).

Se estudió la aidez de tres Abs frente al conjugado BTL2-dextrano-CIPRO, i.e. los MAb FQ8G13A y FQ8G19A, y el antisuero As172. De los tres Abs evaluados, el MAb FQ8G13A fue el que mostró mayor afinidad por la quimera (Figura 76.a). Así mismo, se evaluó la aidez del antisuero As8 frente al conjugado BTL2-dextrano-2f (Figura 76.b) y del MAb anti-biotina frente a BTL2-dextrano-BL (Figura 76.c).

La afinidad del MAb anti-biotina frente a BTL2-dextrano-BL fue muy baja, obteniéndose valores de absorbancia  $< 0.5$  u.a. en todos los casos. Por otra parte se obtuvo una unión no específica elevada para el MAb anti-biotina, aproximadamente del ~40% de la respuesta medida.

A partir de los ensayos de titulación se seleccionaron las concentraciones óptimas de conjugado hapténico y Ab, para el desarrollo de los ensayos ELISA competitivos. En todos los casos se empleó una concentración de biorreactivos (conjugado hapténico y Ab), que proporcione señales de absorbancia, en ausencia de analito, cercanas a la unidad. Se fijó una concentración de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para cada uno de los conjugados hapténicos, 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para el antisuero As8 y 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para los MAb anti-biotina y anti-FQs (FQ8G13A), y se procedió al desarrollo de tres ensayos ELISA competitivos.

**Tabla 27.** Parámetros de ajuste (ecuación 3, Introducción) obtenidos para los ensayos ELISA competitivos. Tapizado: 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  conjugado hapténico en BC 50 mM, pH 9.6 (1 h, 37 °C). Ensayo en PBST, pH 7.4; [MAb FQ8G13A] = 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , [As8] = 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , [MAb anti-biotina] = 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (incubación 30 min); [HRP-Abs anti-IgG] = 167 ng mL<sup>-1</sup> (incubación 30 min); sustratos enzimáticos: TMB (0.6%, m/v) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%, v/v), (30 min), (n = 3).

Parámetro	Conjugado de tapizado (Anticuerpo)		
	BTL2-dextrano-CIPRO (MAb FQ8G13A)	BTL2-dextrano-2f (As8)	BTL2-dextrano-BL (MAb anti-biotina)
Contaminante	ENRO	ATR	BIOTINA
A <sub>max</sub>	0.776	1.12	0.622
b	1.79	0.715	--
A <sub>min</sub>	0.298	0.322	--
r <sup>2</sup>	0.997	0.999	--
LOD <sup>(a)</sup> , $\mu\text{g L}^{-1}$	71 ± 3	0.045 ± 0.007	--
IC <sub>50</sub> <sup>(a)</sup> , $\mu\text{g L}^{-1}$	247 ± 6	0.91 ± 0.06	> 978
DR <sup>(a)</sup> , $\mu\text{g L}^{-1}$	110 – 570	0.13 – 6.6	--

<sup>(a)</sup>  $\pm \text{ts}/\sqrt{n}$ , t<sub>95%</sub>. A<sub>max</sub>: asíntota máxima; b: pendiente en el punto de inflexión; LOD: límite de detección; IC<sub>50</sub>: concentración en el punto de inflexión; DR: intervalo dinámico. RSD = (1 – 8) %.

Se estudió la respuesta del par: 1) As8 / BTL2-dextrano-2f frente a ATR, 2) MAb anti-FQs (FQ8G13A) / BTL2-dextrano-CIPRO frente a ENRO y, 3) MAb anti-biotina / BTL2-dextrano-BL frente a biotina. El intervalo de concentración de analito (ATR, ENRO o biotina) estudiado fue, en todos los casos, de 0 a 10  $\mu\text{M}$ . En la Tabla 27 se recogen los parámetros de ajuste de los datos obtenidos en cada caso.

El ensayo ELISA competitivo para el análisis de TRZs presenta un valor IC<sub>50</sub> y LOD para ATR, de 0.91 ± 0.06  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 0.045 ± 0.007  $\mu\text{g L}^{-1}$  (n = 3), respectivamente, con un DR de 0.13 a 6.6  $\mu\text{g L}^{-1}$ . El límite de detección es inferior al valor legislado para dicho herbicida en agua potable y comparable al descrito en bibliografía para otros ensayos ELISA selectivos a TRZs [450,600].

El ELISA competitivo para el análisis de FQs presentó valores de LOD e IC<sub>50</sub>, frente a ENRO, de 71 ± 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 247 ± 6  $\mu\text{g L}^{-1}$  (n = 3), respectivamente. El LOD obtenido es mayor que el descrito en bibliografía para otros ensayos ELISA selectivos a FQs [458, 601], presentando una sensibilidad notablemente inferior a la observada para el ELISA

selectivo a TRZs. Teniendo en cuenta que la sensibilidad de la micromatriz de biosensores descrita anteriormente (sección 5.3.1.), desarrollada empleando los mismos pares de biorreactivos Ag/Ab utilizados en este ensayo, fue similar frente a TRZs y FQs (Tabla 24), la sensibilidad de los ELISAs para ambos compuestos debería de ser parecida. La menor sensibilidad frente a CIPRO se podría deber al bajo rendimiento de conjugación del antibiótico a la BTL2-dextrano-epoxido posiblemente asociado a la menor basicidad del medio de reacción empleado durante la conjugación (BC 100 mM a pH 10, frente a pH 12 cuando la conjugación se ha llevado a cabo con el derivado BTL2-dextrano inmovilizado sobre la guía de onda). Otra hipótesis que se planteó fue el posible efecto del grado de conjugación del hapteno sobre la eficacia de la etapa de desorción del conjugado hapténico del soporte OS, la cual podría disminuir al aumentar el grado de conjugación, desorbiéndose principalmente unidades BTL2-dextrano-CIPRO con un menor número de moléculas CIPRO por molécula de lipasa.

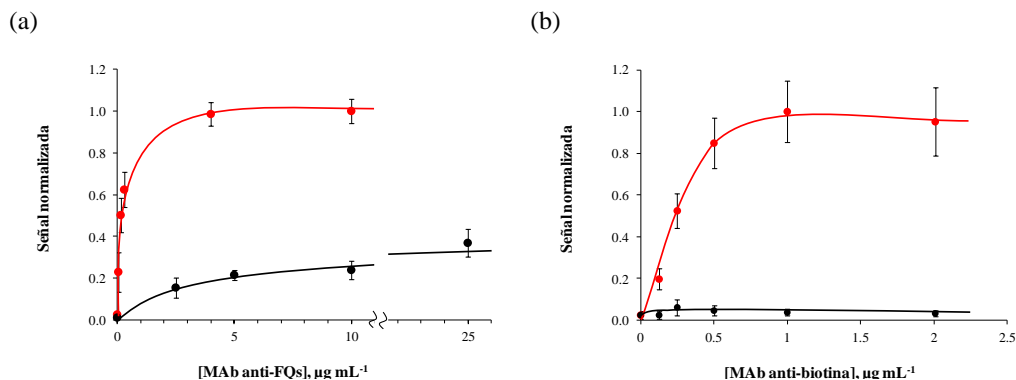
Finalmente, la respuesta frente a biotina al emplear los biorreactivos BTL2-dextrano-BL / MAb anti-biotina en un ELISA competitivo también fue baja, observándose una inhibición de la absorbancia para concentraciones de analito  $\geq 5 \mu\text{M}$  ( $1.22 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Con el fin de mejorar estos resultados, se planteó la síntesis de nuevos derivados de CIPRO y biotina en disolución homogénea, para evitar la etapa final de desorción de la fase sólida necesaria en las síntesis anteriores.

Se sintetizó un conjugado BTL2-dextrano-CIPRO-2, partiendo del derivado BTL2-dextrano-epoxidado liofilizado. Para ello, 1 mg del derivado BTL2-dextrano-epoxidado se disolvió en 1 mL de una disolución de CIPRO ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  en BC 100 mM, pH 12) incubándose con agitación magnética durante 70 h. La mezcla de reacción se dializó durante 72 h (CELLU-SEP®, MWCO 3500), para eliminar el hapteno sin reaccionar, y el conjugado BTL2-dextrano-CIPRO-2 se liofilizó. Por último, la conjugación del hapteno CIPRO se confirmó analizando el conjugado mediante XPS.

Para síntesis del conjugado BTL2-dextrano-biotina, se disolvieron 0.6 mg de D-biotina en 100  $\mu\text{L}$  de tampón MES 50 mM a pH 6, adicionándose seguidamente EDC y NHS (concentración final en mezcla 1 M y 0.5 M respectivamente). Sobre esta mezcla se adicionaron 900  $\mu\text{L}$  de BTL2-dextrano-NH<sub>2</sub> ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  en MES 50 mM, pH 6), incubándose con agitación magnética durante 12 h. Finalmente, el exceso de biotina, EDC y NHS se eliminó mediante diálisis (72 h; membrana CELLU-SEP®, MWCO 3500) y el conjugado BTL2-dextrano-biotina se liofilizó.

Seguidamente, se comparó la respuesta obtenida con los conjugados hapténicos sintetizados en fase homogénea y los sintetizados en fase sólida. Para ello, la guía de onda se funcionalizó en distintas secciones con los conjugados BTL2-dextrano-CIPRO



**Figura 77.** (a) Afinidad del MAb anti-QFs FQ8G13A frente a los conjugados (●) BTL2-dextrano-CIPRO (síntesis en fase sólida) y (●) BTL2-dextrano-CIPRO-2 (síntesis en fase líquida disuelta). (b) Grado de reconocimiento del MAb anti-biotina frente a los conjugados (●) BTL2-dextrano-BL (síntesis en fase sólida) y (●) BTL2-dextrano-biotina (síntesis en fase líquida disuelta). Funcionalización de la guía de onda: 1) derivatización con HMDS; 2) inmovilización del conjugado hapténico ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  en PBS, pH 7.4; 30 min); 3) bloqueo (3% leche en PBST, 90 min). Ensayo en PBST, pH 7.4; Incubación con MAb anti-biotina o anti-FQs, 20 min; [AlexaFluor647-Ab anti-IgG] =  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 20 min ( $n = 5$ ).

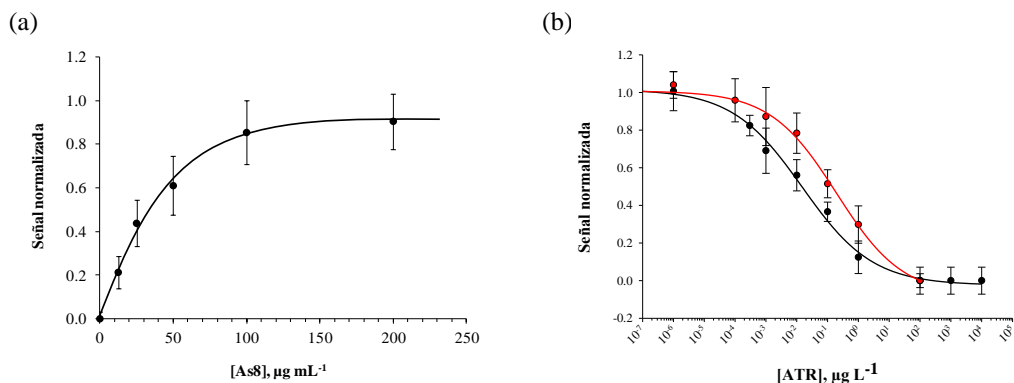
(síntetizado en fase sólida) y BTL2-dextrano-CIPRO-2 (síntetizado en fase líquida disuelta), midiéndose la intensidad de fluorescencia obtenida en presencia de concentraciones crecientes de MAb anti-FQs (FQ8G13A).

La afinidad del MAb FQ8G13A frente al conjugado BTL2-dextrano-CIPRO-2 fue notablemente superior a la obtenida para el conjugado sintetizado en fase sólida, dando lugar a una intensidad de fluorescencia cuatro veces mayor (Figura 77.a), por lo que se seleccionó para el desarrollo de la micromatriz de biosensores.

Del mismo modo se comparó la respuesta de los conjugados BTL2-dextrano-BL y BTL2-dextrano-biotina, frente a concentraciones crecientes de MAb anti-biotina (Figura 73.b). Solo se observó reconocimiento selectivo por parte del MAb anti-biotina del conjugado BTL2-dextrano-biotina, el cual se seleccionó para su uso como control positivo en el desarrollo de la plataforma biosensora.

### 5.3.2.2. Aplicación de los conjugados al desarrollo de una micromatriz de sensores para el análisis simultáneo de fluoroquinolonas y triazinas.

Los conjugados sintetizados, BTL2-dextrano-2f y BTL2-dextrano-CIPRO-2, se aplicaron al desarrollo de un *microarray* para el análisis simultáneo de TRZs y FQs, empleando el conjugado BTL2-dextrano-biotina como control positivo.



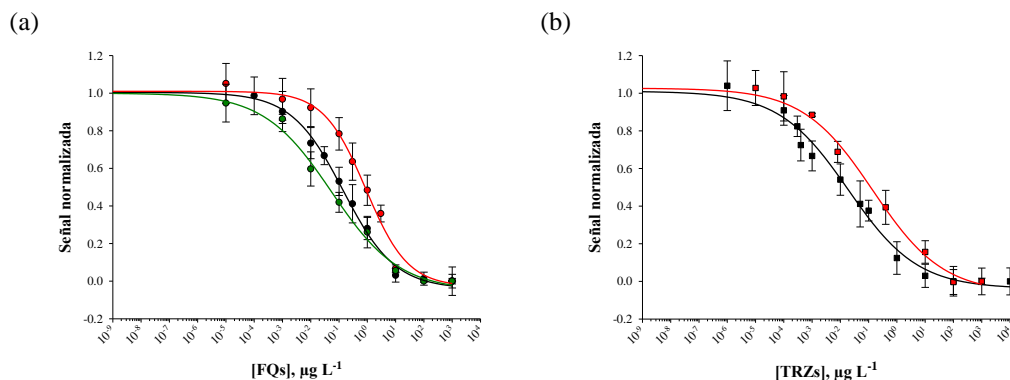
**Figura 78.** (a) Efecto de la concentración de As8, en la respuesta del biosensor. Funcionalización de la guía de onda: BTL2-dextrano-2f (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en PBS, pH 7.4; 30 min). (b) Curva de calibrado para la determinación de ATR obtenida con el *microarray* empleando una concentración de As8: (•) 20 y (•) 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Ensayo en PBS, pH 7.4; Incubación As8, 20 min; [AlexaFluor647-Ab anti-IgG] = 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; incubación, 20 min; (n = 5).

Como se indicó anteriormente, la funcionalización de la guía de onda, previamente derivatizada con el silano HMDS, se llevó a cabo en una única etapa (30 min de incubación con los conjugados) lo cual simplifica notablemente la etapa de preparación del chip.

Se estudió el efecto de la concentración de conjugado en la disolución de tapizado (10 – 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en la intensidad de la señal analítica, seleccionándose para posteriores ensayos una concentración de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que conduce a la mayor intensidad de señal en ausencia de analito en la muestra ( $B_0$ ) (datos no mostrados).

Fijando la concentración de conjugado BTL2-dextrano-2f, se evaluó el efecto de la concentración de As8 adicionada a la muestra, en la respuesta del biosensor. Se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia, medida en ausencia de TRZs, al aumentar la concentración de As8 (Figura 78.a). Concentraciones menores de Ab originaron una disminución tanto el valor  $IC_{50}$  como del LOD de la micromatriz, obteniéndose intervalos dinámicos más amplios (Figura 78.b). Finalmente se seleccionó una concentración de As8 de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para el desarrollo del biosensor, dado que su empleo proporcionó mayor sensibilidad así como, una buena intensidad de señal y reproducibilidad en las medidas.

Así mismo, se observó un incremento en la intensidad de señal medida en ausencia de FQs ( $B_0$ ), al aumentar la concentración de MAb anti-QFs FQ8G13A empleada en el ensayo (Figura 77.a), alcanzando un valor máximo para concentraciones iguales o superiores a 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . La mejor respuesta, en términos de LOD e  $IC_{50}$ , se obtuvo para



**Figura 79.** Curvas de calibrado obtenidas con el *microarray* para la determinación de: (a) antibióticos FQs (•) ENRO, (•) SARA y (•) CIPRO y, (b) pesticidas TRZs (■) ATR y (■) SIM. Funcionalización de la guía de onda: [BTL2-dextrano-hapteno] = 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en PBS, pH 7.4; incubación, 30 min. Ensayo en PBS, pH 7.4; [MAb anti-QFs FQ8G13A] = 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [As8] = 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [MAb anti-biotina] = 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Incubación con la muestra, 20 min; [AlexaFluor647-Ab anti-IgG] = 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , incubación 20 min, (n = 5 réplicas por micromatriz).

una concentración 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Concentraciones superiores (2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) originaron una disminución de la sensibilidad del inmunoensayo mientras que concentraciones inferiores (0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) propiciaron respuestas instrumentales bajas, disminuyendo la reproducibilidad en las medidas

Por último, se seleccionó una concentración de MAb anti-biotina de 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , por proporcionar una respuesta de intensidad apropiada para su uso como control positivo.

La Figura 79 recoge las curvas de calibrado obtenidas para distintos antibióticos FQs (i.e. ENRO, CIPRO y SARA) y pesticidas TRZs (i.e. ATR y SIM), empleando la micromatriz de biosensores desarrollada.

El *microarray* permite el análisis simultáneo de FQs y TRZs, presentando LODs entre 0.05 y 23  $\text{ng L}^{-1}$ , dependiendo del analito evaluado (Tabla 28). La sensibilidad del biosensor es del orden [538] o superior a la de otros inmunosensores descritos en bibliografía para FQs [532,534] y TRZs [536,539,544-546], con la ventaja añadida de permitir su análisis simultáneo, en hasta seis muestras, en 60 min.

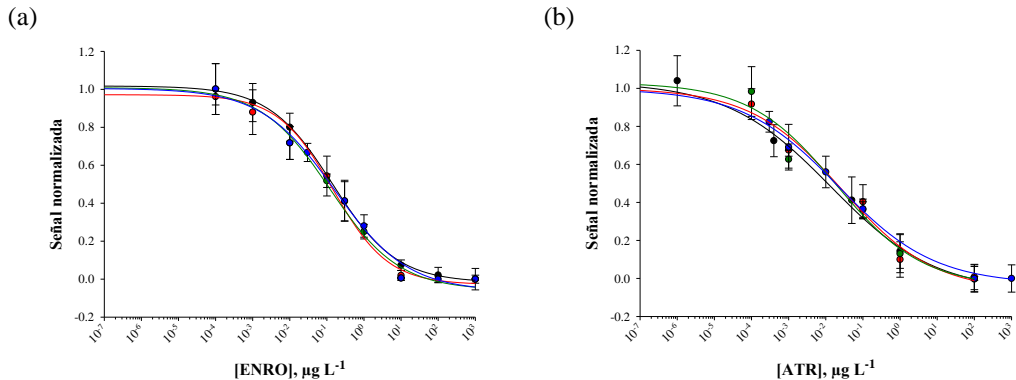
La respuesta en las distintas áreas sensoras de la guía de onda presentó una buena reproducibilidad, con valores de RSDs del 9 al 22%, en el intervalo dinámico de trabajo. La reproducibilidad entre micromatrices se evaluó midiendo los calibrados para

**Tabla 28.** Características analíticas de la plataforma biosensora multianalito para la determinación simultánea de TRZs y FQs. (n = 5).

Parámetro <sup>(a)</sup> \ Analito	Par conjugado hapténico/anticuerpo				
	BTL2–dextrano–2f/As8		BTL2–dextrano–CIPRO/MAb FQ8G13A		
	ATR	SIM	ENRO	CIPRO	SARA
LOD, ng L <sup>-1</sup>	0.05 ± 0.01	0.4 ± 0.1	1.6 ± 0.3	0.11 ± 0.02	23 ± 2
IC <sub>50</sub> , ng L <sup>-1</sup>	27 ± 5	140 ± 10	143 ± 8	54 ± 3	880 ± 50
DR, ng L <sup>-1</sup>	0.4 – 470	3 – 3800	8 – 1600	1 – 1300	80 – 7700
CR (%)	100	19	100	265	16

<sup>(a)</sup>  $\pm ts/\sqrt{n}$ ,  $t_{95\%}$ . LOD: límite de detección; IC<sub>50</sub>: concentración en el punto de inflexión; DR: intervalo dinámico; CR: reactividad cruzada. ATR: atrazina; SIM: simazina; ENRO: enrofloxacin; CIPRO: ciprofloxacino; SARA: sarafloxacin.

los distintos analitos con cuatro guías de onda en distintos días de trabajo (n = 5 medidas por micromatriz, Figura 80). A partir de los mismos, se calcularon varores de IC<sub>50</sub> de 143 ng L<sup>-1</sup> (RSD = 10%) para ENRO y de 27 ng L<sup>-1</sup> (RSD = 23%) para ATR, comparables a valores descritos en bibliografía para inmunoensayos basados en el mismo principio de medida.



**Figura 80.** Curvas de calibrado normalizadas obtenidas con 4 micromatrices, en 4 días de medida, para evaluar la reproducibilidad del biosensor: (a) ENRO y (b) ATR. Muestras preparadas en (•, •, •, •) PBS pH 7.4 y, (•) agua de grifo tamponada. Funcionalización de la guía de onda: [BTL2–dextrano–hapteno] = 100 µg mL<sup>-1</sup> en PBS, pH 7.4; incubación, 30 min. Ensayo: [MAb anti-QFs FQ8G13A] = 0.25 µg mL<sup>-1</sup>, [As8] = 20 µg mL<sup>-1</sup>, [MAb anti-biotina] = 0.1 µg mL<sup>-1</sup>. Incubación con la muestra, 20 min; [AlexaFluor647–Ab anti-IgG] = 10 µg mL<sup>-1</sup>; incubación, 20 min, (n = 5 réplicas por micromatriz).

Con el objetivo de regenerar la superficie sensora, permitiendo su reutilización sucesiva para más de un análisis, se empleó una disolución NaOH 50 mM. El tratamiento con NaOH durante 48 s ( $0.8 \text{ mL}$ ,  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ) fue suficiente para regenerar las superficies funcionalizadas con BTL2-dextrano-2f y BTL2-dextrano-biotina (control positivo). Las guías de onda funcionalizadas con BTL2-dextrano-CIPRO requirieron tiempos de regeneración ligeramente superiores, de aproximadamente 96 s ( $2 \times 0.8 \text{ mL}$ ,  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ). No se observaron diferencias significativas en la respuesta de la micromatriz de biosensores durante 3 ciclos de ensayo-regeneración sucesivos. Un mayor número de regeneraciones de la guía de onda condujeron a un aumento de la señal de fondo empeorando, de forma significativa, la relación señal-ruido.

Dado que la unión de los conjugados a la superficie del vidrio se produce mediante interacciones hidrofóbicas a través del centro activo de la lipasa BTL2, en principio, es reversible. Se estudió, por tanto, la posibilidad de romper dicha unión, para regenerar la superficie del chip y reutilizar la guía de onda tapizando con una nueva combinación de conjugados hapténicos. Para ello, se evaluó la capacidad de desorción de distintos medios, *i.e.* mezclas hidro-orgánicas de MeOH (30%), etanol (70%) y acetona (50%), disolventes orgánicos (MeOH, dioxano), disoluciones acuosas con alto contenido en surfactantes (5% triton X100) y medios desnaturalizantes (urea 8 M). Así, tras la funcionalización de la guía de onda y su empleo en el análisis de muestras de agua, la superficie se incubó (1 h) en el medio de regeneración. Tras comprobar la ausencia de fluorescencia, se llevó a cabo un nuevo inmunoensayo. El biochip retuvo entre el 25 - 100 % de la señal de fluorescencia inicial, dependiendo del medio de regeneración empleado, lo que indica que los medios evaluados, si bien puede romper la interacción Ag-Ab, no permiten la desorción cuantitativa del conjugado de tapizado. Dicha desorción no se logró, incluso tras incrementar el tiempo de contacto con la disolución de regeneración a 16 h.

Por último, para evaluar la existencia de efecto matriz, la respuesta del *microarray* desarrollado se calibró en muestras de agua potable (agua de grifo), libres de FQs y TRZs, a un nivel de concentración inferior al LOD del método. Las muestras filtradas se analizaron directamente, tras ajustar el pH a 7.0 - 7.5 mediante la adición de sales de fosfato. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los casos, con los calibrados obtenidos en PBS (Figura 80).

En la Tabla 29 se comparan los resultados obtenidos con las guías de onda funcionalizadas, en una o dos etapas, con los conjugados BTL2-dextrano derivatizados con los haptenos CIPRO y 2f. La funcionalización en dos etapas permitió obtener mayor sensibilidad para el análisis de ENRO e intervalos dinámicos comparables. En el caso



**Tabla 29.** Comparación de la respuesta obtenida con los *microarrays* preparados funcionalizado las guías de onda mediante un proceso en una etapa (inmovilización de conjugados hapténicos) o dos etapas (1. inmovilización de derivados BTL2–dextrano, 2. conjugación del hapteno).

		Analito			
		ATR		ENRO	
Funcionalización	Parámetro <sup>(a)</sup>	1 etapa	2 etapas	1 etapa	2 etapas
LOD, ng L <sup>-1</sup>		0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.05	1.6 ± 0.3	0.11 ± 0.04
IC <sub>50</sub> , ng L <sup>-1</sup>		27 ± 5	18 ± 4	143 ± 8	75 ± 9
DR, ng L <sup>-1</sup>		0.4 – 470	0.6 – 230	8 – 1600	2.2 – 1600

<sup>(a)</sup>  $\pm ts/\sqrt{n}$ ,  $t_{95\%}$ . LOD: límite de detección; IC<sub>50</sub>: concentración en el punto de inflexión; DR: intervalo dinámico. ATR: atrazina; SIM: simazina; ENRO: enrofloxacino; CIPRO: ciprofloxacino; SARA: sarafloxacino.

de ATR las sensibilidades resultaron comparables, si bien el intervalo dinámico es superior empleando una única etapa de funcionalización. En cualquier caso, el empleo de una única etapa de funcionalización permite reducir de forma significativa el tiempo requerido para la preparación de los *microarrays*.

En la Tabla 29 se comparan los resultados obtenidos con las guías de onda funcionalizadas, en una o dos etapas, con los conjugados BTL2–dextrano derivatizados con los haptenos CIPRO y 2f. La funcioalización en dos etapas permiti obtener mayor sensibilidad para el análisis de ENRO e intervalos dinámicos comparables. En el caso de ATR las sensibilidades resultaron comparables, si bien el intervalo dinámico es superior empleando una única etapa de funcionalización. En cualquier caso, el empleo de una única etapa de funcionalización permite reducir de forma significativa el tiempo requerido para la preparación de los *microarrays*.

Los resultados descritos en este capítulo demuestran la viabilidad de la aproximación propuesta, basada en el empleo de conjugados BTL2–dextrano–hateno, para la preparación de plataformas sensoras multianalito. El empleo de este tipo de conjugados, permite la inmovilización de haptenos de bajo peso molecular mediante un proceso sencillo y rápido, lo que es de suma utilidad cuando se quiere desarrollar micromatrices de biosensores para la determinación simultánea de analitos de distinta naturaleza. La posibilidad de preparar y almacenar los conjugados derivatizados e inmovilizarlos sobre las guías de onda, tras una etapa de incubación de 30 min, es una

ventaja adicional frente a los métodos de fabricación de microarrays descritos en la bibliografía. Además, facilita la aplicación para medidas *in situ* con estos biosensores.



## CONCLUSIONS

---



### **Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction (PLE) for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs.**

1. A simple, fast and efficient method based on pressurized liquid extraction (PLE) has been optimized for the extraction of three fluoroquinolone (FQ) antibiotics namely, enrofloxacin (ENRO) ciprofloxacin (CIPRO) and sarafloxacin (SARA), from whole egg samples.
2. The extracted samples have been analyzed by HPLC with fluorescence detection without further clean-up or preconcentration.
3. The best extraction recoveries (67 – 90%, RSDs < 11%), and minimized matrix effects, have been achieved using phosphate buffer 50 mM, pH 3.0/AcN (50:50, v/v) as extraction solvent, 50% flush volume, 5 min of static time and 3 extraction cycles at 70 °C and 1500 psi.
4. The application of PLE enabled better or comparable extraction recoveries than other widely applied methods with a significant reduction of extraction time, solvent consumption and sample handling.
5. The method has been validated according to the guidelines of the Directive 96/23/EC. The decision limit ( $CC_{\alpha}$ ) and detection capability ( $CC_{\beta}$ ) of the analytical method were found to be within the range 17 – 24 ng g<sup>-1</sup> and 30 – 41 ng g<sup>-1</sup>, respectively.
6. The method has been successfully applied to the determination of ENRO and its metabolite CIPRO in incurred egg samples from ENRO-treated hens and LC-MS has been used and for confirmatory purposes.

### **Preparation of antibodies and development of a sensitive immunoassay with fluorescence detection for triazine herbicides.**

1. Two immunogens have been prepared by coupling a home-synthesized hapten derivative of simazine (6-chloro-*N*-ethyl-*N*'-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine, SIM) to lysine groups of KLH (keyhole limpets hemocyanin) and BSA (bovine serum albumin) as carrier proteins. The KLH-2c conjugate has been used for rabbit immunization.
2. The avidity of the antisera for six enzymatic tracers (ETs) derived from triazine structures has been determined by ELISA. The antiserum As8 and the HRP-2f

tracer have provided the best assay sensitivity for SIM (LOD and  $IC_{50}$  of  $0.11 \pm 0.02 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $0.88 \pm 0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively).

3. The antiserum As8 and the HRP-2f tracer have been applied to the development of an automated sensitive flow-through immunosensor. The optimized assay presents an  $IC_{50}$  value of  $0.35 \pm 0.04 \mu\text{g L}^{-1}$  and a LOD of  $0.0013 \pm 0.0009 \mu\text{g L}^{-1}$  with a DR from 0.010 to  $7.5 \mu\text{g L}^{-1}$  for SIM, improving the performance of conventional ELISAs, and shows a high reusability, excellent precision and short analysis times.
4. The antiserum has shown a good cross-reactivity for other triazine compounds such as, atrazine (ATR, 420%), propazine (130%), terbutylazine (6.4%), desethyl-atrazine (2.2%), whereas non related herbicides (2,4-D or linuron) did not show cross reactivity in the evaluated range..
5. The immunosensor has been successfully applied to the direct analysis of SIM in contaminated river waters at the  $\text{ng L}^{-1}$  level, and validated by comparison with two reference chromatographic methods (*i.e.* SPE/HPLC-DAD and SPE/GC-NPD).

#### **An SPR biosensor for the detection of microcystins in drinking water.**

1. An SPR-based immunosensor for the determination of microcystins (MCs) in drinking water has been developed.
2. Several assay formats have been tested immobilizing either, an anti-MC antibody, a MCLR conjugate or MCLR itself. The selected format is based on a competitive inhibition assay, in which microcystin-LR (MCLR) has been covalently immobilized onto the surface of an SPR chip functionalized with an amine-alkanethiol-self-assembled monolayer (SAM), and the binding of anti-MC monoclonal antibodies to immobilized MCLR is competitively inhibited by the hepatotoxin in the sample solution.
3. The optimized SPR biosensor has provided an  $IC_{50}$  of  $0.67 \pm 0.09 \mu\text{g L}^{-1}$ , a LOD of  $73 \pm 8 \text{ ng L}^{-1}$ , lower than those reported for other SPR-based devices, and a DR from 0.2 to  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$ , allowing the determination of MCLR in drinking water at levels below the provisional guideline value of  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  proposed by the World Health Organization (WHO) for drinking water, in a fast and sensitive way.

4. In addition to MCLR, the biosensor has shown a good cross-reactivity for other MCs variants, such as microcystin-RR (MCRR, 88%) and microcystin-YR (MCYR, 94%) which, together with MCLR are widely distributed in Spanish rivers and lakes.
5. The SPR biosensor can perform four simultaneous determinations in 60 min and shows high stability, good reusability (at least 40 assay-regeneration cycles with the same chip) and excellent precision.
6. The MCs biosensor has been successfully applied to the direct analysis of MCLR in drinking water samples without further clean-up or pre-concentration steps.

#### **Automated portable array biosensor for multisample microcystin analysis in freshwater samples.**

1. An automated array biosensor based on evanescent-wave excitation has been developed for the detection of MCs in freshwater samples.
2. The  $IC_{50}$  ( $0.34 \pm 0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and the LOD ( $16 \pm 3 \text{ ng L}^{-1}$ ) for MCLR are lower than those reported for other biosensors based on different transduction techniques, including label-free methods such as SPR.
3. The biosensor has shown excellent cross-reactivity for other MC variants, such as MCRR (90%), microcystin-RR desmethylated (dm-MCRR, 95 %) and MCYR (91%), acceptable stability, reusability (at least 15 assay-regeneration cycles with the same chip) and excellent precision.
4. The configuration of the instrument allows the simultaneous analysis of up to six samples within short analysis times (60–70 min), and the system is fully automated, portable, and highly competitive with laboratory techniques.
5. The biosensor has been successfully applied to the direct analysis of surface water samples without further clean-up or preconcentration, and the results were fully comparable to those obtained by HPLC-MS/MS as an alternative technique, demonstrating the potential of the developed biosensor for MCs determination at  $\text{ng L}^{-1}$  level, in water samples.



**Dextran–lipase conjugates as novel tools for low molecular weight ligand immobilization in microarray development.**

1. Novel dextran–BTL2 conjugates have been synthesized. The effective lipase modification with the polysaccharide network was confirmed by Raman and FTIR spectroscopies.
2. The chimeras have been immobilized by nonspecific hydrophobic interactions onto the surface of planar waveguides obtaining highly ordered and homogeneous molecular architectures as confirmed by AFM. The chimeras have been further functionalized with low molecular weight haptens, such as MCLR, without compromising the stability of the conjugate monolayer as also confirmed by AFM. These platforms have been applied to the development of fluorescent-based microarray immunosensors
3. Modifying BTL2 with dextrans of an increased molecular weight (>6 kDa) has provided surfaces with increased loading capacity that has been attributed to the creation of 3D surfaces by effect of the analyte binding deep in the volume as opposed to the surface alone.
4. The usefulness of this approach to immunosensor development has been demonstrated by determining trace amounts of MCLR down to a few picograms per liter with an automated array biosensor and evanescent wave excitation for fluorescence measurements of attached DyLight649–labeled secondary antibody.
5. The use of dextran–BTL2 conjugates has allowed a significant decrease in the detection limit ( $0.007 \pm 0.001 \text{ ng L}^{-1}$ ) and the  $IC_{50}$  value ( $4.4 \pm 0.7 \text{ ng L}^{-1}$ ), as well as a broader DR ( $0.09 - 136.56 \text{ ng L}^{-1}$ ) in comparison to the results obtained with the SPR-based sensor and the fluorescence microarray based on direct MCLR immobilization developed in this thesis.

**Development of multi-analysis biosensing platforms for the analysis of microcystins, fluoroquinolones and triazines in water samples.**

1. An automated array biosensor based on evanescent-wave excitation has been developed for the multiplex detection of MCLR, ENRO and ATR in water samples, combining three individual competitive immunoassays in a planar configuration. The identity of the target analyte is encoded by its location in the detection platform.

2. Dextran-BTL2 conjugates with different functional groups have been synthesized and immobilized by hydrophobic interactions on the surface of planar waveguides. The chimeras have been coupled to different haptens (*i.e.* MCLR, CIPRO and 2f) for the preparation of the biosensing platforms.
3. Alternatively, the chimeras have been coupled to different haptens (*i.e.* CIPRO, 2f and biotin) and further immobilized on the surface of the biosensing platforms.
4. The developed microarray biosensor has allowed the simultaneous analysis of MCLR, ENRO and ATR in up to six samples at concentration in the  $\text{ng L}^{-1}$  level, or below, in tap water samples without further clean-up or pre-concentration steps and within short analysis times (60–70 min).
5. This approach has a great potential for multiplexed sensing of low molecular weight molecules by immobilizing the desired array of hapten-dextran-BTL2 conjugates on the sensing platform without the need of waveguide functionalization.



## BIBLIOGRAFÍA

---



- 
- [1] Doménech, X. (1999). El ciclo de los contaminantes, en: *Química de la contaminación*. Miraguano Ed., Madrid.
  - [2] Den Bogaard, A.E.; Stobberingh, E.E. (2000) *Int. J. Antimicrob. Agents* 14, 327 – 335.
  - [3] McEwne, S.A.; Fedorka-Cray, P.J. (2002) *Clin. Infect. Dis.* 34, S93 – S106.
  - [4] Novail, A.; Comas, I.; Baquero, F.; Cantón, R.; Coque, T.M.; Moya, A.; González, F.; Galán, J.C. (2010) *PLoS Pathog.* 6, 1 – 16.
  - [5] Pérez Ázquez, M.D. (2004) Tesis Doctoral, *Universidad Complutense de Madrid*.
  - [6] Pruden, A. (2009) Occurrence and Transport of Antibiotics from CAFOs, en: *Hormones and pharmaceuticals generated by concentrated animal feeding operations. Transport in water and soil*. Shore, L.S.; Pruden, A.; Eds. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
  - [7] Barceló, D.; Petrovic, M. (2008) *Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste. Occurrence, Analysis and Effects*. Ed. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
  - [8] Merrington, G.; Winder, L.; Parkinson, R.; Redman, M. (2005) Pesticides, en: *Agricultural Pollution: Environmental Problems and Practical Solutions*. Ed. Taylor & Francis Group, Londres.
  - [9] Katagi, T. (2010) *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 204, 1 – 132.
  - [10] Van Egmond, H.P. (2004) *Anal. Bional. Chem.* 378, 1152 – 1160.
  - [11] Pérez, D.S.; Soraci, A.; Tapia, M. (2008) *Analecta Veterinaria* 28, 48 – 56.
  - [12] <http://www.wri.org/project/eutrophication/map>
  - [13] Quesada, A.; Carrasco, D.; Cirés, S. (2006) Cianobacterias en aguas de consumo y de recreo: un problema de todos. Ponencia en el Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX).
  - [14] <http://lema.rae.es/drae/>
  - [15] Gómez-Lus, M.L.; Calvo, A.; Prieto, J. (2009) Antibióticos y quimioterápicos. Generalidades, en: *Farmacología Básica y Clínica – Velazquez*. Lorenzo, P.; Moreno, A.; Leza, J.C.; Lizasoain, I.; Moro, M.A.; Pórtolés, A.; Ed. Médica Panamericana, 18ª Edición, Madrid.
  - [16] Christian, J.S. (1996) *Primary Care Update for OB/GYNS* 3, 87 – 92
  - [17] Botana, L.M.; Landoni, M.F.; Martín-Jiménez, T. (2002) Antimicrobianos que inhiben la función de los ácidos nucleicos, en: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Ed. McGrawHill interamericana, Madrid.

- [18] Sumano, H.S.; Ocampo, L. (1997) Quinolonas y fluoroquinolonas, en: *Farmacología Veterinaria*. Ed. McGrawHill interamericana, 2ª Edición, México.
- [19] O'Donnell, J.A.; Gelone, S.P. (2000) *Infect. Dis. Clinics North America* 14, 489 - 513.
- [20] Rothilin, R.P. (1999) *Medicina* 59, 3 - 7.
- [21] Blum, M.D.; Graham, D.J.; Mc Closkey, C.A. (1994) *Clin. Infect. Dis.* 18, 946 - 950.
- [22] The European Agency for the Evaluation of Medical Products. (1999) Human Medicines Evaluation Unit. Public statement on Trovan/Trovan IV/Turvel/Turvel IV (trovafloxacin/alatrofloxacin). Serious, severe and unpredictable liver injuries. EMEA, 15770, 1 - 3.
- [23] Hernández-Arteseros, J.A.; Barbosa, J.; Compañó, R.; Prat, M.D. (2002) *J. Chromatogr. A* 945, 1 - 24.
- [24] Doll, J. (1982) *Los Herbicidas: modo de actuar y sintomas de toxicidad*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali.
- [25] Smolková, E.Jr.; Pacáková, V. (1978) *Chromatographia* 11, 698 - 702.
- [26] Sánchez Martín, M.J.; Sánchez Camazano, M. (1984) Los plaguicidas. Adsorción y evolución en el suelo. *Temas monográficos*, 14. I.O.A.T.O. Centro de Edafología y Biología Aplicada. Excma. Diputación Provincial de Salamanca.
- [27] Barchanska, H.; Baranowska, I. (2009) *Rev. Environ. Contam. T.* 200, 53 - 84.
- [28] Müller, G. (2008). History of the discovery and development of triazine herbicides, en: *The Triazine Herbicides: 50 years revolutionizing agriculture*. Ed. Elsevier B.V., Amsterdam.
- [29] Cacho, C. (2009) Tesis Doctoral, *Universidad Complutense de Madrid*.
- [30] Richardson, M.L. (1991) *J. Agric. Sci.* 119, 285 - 290.
- [31] [http://www.epa.gov/oppsrrd1/cumulative/triazine\\_fs.htm](http://www.epa.gov/oppsrrd1/cumulative/triazine_fs.htm)
- [32] De la Cruz, M.; Palero, J.M.; Lucena Rodríguez, R.; Cárdenas Aranzana, S.; Valcárcel, M. (2012) *Rev. Esp. Salud Pública* 86, 21 - 35.
- [33] Lanzarot Freudenthal, M.P. (2007) Tesis Doctoral, *Universidad Complutense de Madrid*.
- [34] Hallegraeff, G. (1992) *Phycologia* 32, 79 - 99.
- [35] Azevedo, S.M.F.O.; Carmichael, W.W.; Jochimsen, E.M.; Rinehart, K.L.; Lau, S.; Shaw, G.R.; Eaglesham, G.K. (2002) *Toxicology* 181 - 182, 441 - 446.

- 
- [36] Sivonen, K.; Jones, G. (1999) Cyanobacterial toxins, en: *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chorus, I.; Bartram, J.; WHO, E&FN Spon, Londres.
- [37] Roset, J.; Aguayo, S.; Muñoz, M.J. (2001). *Rev. Toxicol.* 18, 65 – 71.
- [38] Carrillo, E.; Ferrero, L.M.; Alonso-Andicoberry, C.; Basanta, A.; Martín, A.; López-Rodas, V.; Costas, E. (2003) *Phycologia* 42, 269 – 274.
- [39] Zurawell, R.W.; Chen, H.; Burke, J.M.; Prepas, E.E. (2005) *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 8, 1 – 5.
- [40] Codd, G.A.; Bell, S.G. (1996) The Occurrence and Fate of Blue-Green Algal Toxins. National Rivers Authority R & D Report No. 29. HMSO, London.
- [41] Codd, G.A.; Bell, S.G.; Kaya, K.; Ward, C.J.; Beattie, K.A.; Metcalf, J.S. (1999) *Eur. J. Phycol.* 34, 405 – 415.
- [42] Campo, F.F.; Ouahid, Y. (2010) *Environ. Pollut.* 158, 2906 – 2914.
- [43] Vela, L.; Sevilla, E.; Martín, B.; Pellicer, S.; Bes, M.T.; Fillat, M.F.; Peleato, M.L. (2007) *Rev. Real Academia de Ciencias. Zaragoza* 62, 135 – 146.
- [44] Falconer, I.R.; Yeung, D.S.K. (1992) *Chem. Biol. Interact.* 81, 181 – 196.
- [45] Wera, S.; Hemming, B.A. (1995) *Biochem. J.* 311, 17 – 29.
- [46] Spoof, L. (2005) Microcystins and nodularins, en: *Toxic. Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis*. Meriluoto, J. Codd, G.A.; Åbo Akademis Förlag – Åbo Akademi University Press, Finlandia.
- [47] Carrasco, D. (2007) Tesis Doctoral, *Universidad Autónoma de Madrid*.
- [48] Ito, E.; Kondo, F.; Terao, K.; Harada, K.I. (1997) *Toxicon* 35, 1453 – 1457.
- [49] Ueno, Y.; Nagata, S.; Tsutsumi, T.; Hasegawa, A.; Watanabe, M.; Park, H.D.; Chen, G.C.; Chen, G.; Yu, S.Z. (1996) *Carcinogenesis* 17, 1317 – 1321.
- [50] Codd, G.A. (2000) *Ecol. Eng.* 16, 51 – 60.
- [51] Codd, G.A.; Lindsay, J.; Young, F.M.; Morrison, L.F.; Metcalf, J.S. (2005) *Toxicol. Appl. Pharm.* 203, 264 – 272.
- [52] Alonso-Andicoberry, C.; García-Villada, L.; López-Rodas, V.; Costas, E. (2002) *Vet. Rec.* 151, 706 – 707.
- [53] Chittick, E.; Puschner, B.; Walsh, M.; Gearhart, S.; St. Leger, J.; Skoncelas, E.; Branch, S. (2002) Blue-green algae microcystin toxicosis in captive Chilean flamingos, en: *Proceeding of the American Association of Zoo Veterinarians*, Baer, C.K.; Milwaukee.



- [54] Ballot, A.; Krienitz, L.; Kotut, K.; Wiegand, C.; Metcalf, J.S.; Codd, G.A.; Pflugmacher, S. (2004) *J. Plankton Res.* 26, 925 – 935.
- [55] Krienitz, L.; Ballot, A.; Kotut, K.; Wiegand, C.; Putz, S.; Metcalf, J.S.; Codd, G.A.; Pflugmacher, S. (2003) *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 141 – 148.
- [56] WHO (1998) Algas y cianobacterias en aguas dulces, en: *Guía para ambientes seguros en aguas recreativas 1: Algas costeras y aguas dulces*. Ginebra.
- [57] Tisdale, E.S. (1931) *Am. J. Public Health* 21, 198 – 200.
- [58] Teixeira, M.G.L.C.; Costa, M.C.N.; Carvalho, V.L.P.; Pereira, M.S.; Hage, E. (1993) *Bull. Pan. Am. Health Organ.* 27, 244 – 253.
- [59] Falconer, I.R.; Beresford, A.M.; Runnegar, M.T.C. (1983) *Med. J. Aust.* 1, 511 – 514.
- [60] Dillenberg, H.O.; Dehnel, M.K. (1960) *Can. Med. Assoc.* 83, 1151 – 1154.
- [61] Turner, P.C.; Gammie, A.J.; Hollinrake, K.; Codd, G.A. (1990) *Brit. Med. J.* 300, 1440 – 1441.
- [62] Pilotto, L.S.; Douglas, R.M.; Burch, M.D.; Cameron, S.; Beers, M.; Rouch, G.R.; Robinson, P.; Kirk, M.; Cowie, C.T.; Hardiman, S.; Moore, C.; Attewell, R.G. (1997) *Aust. N. Zealand J. Public Health* 21, 562 – 566.
- [63] Jochimsen, E.M.; Carmichael, W.W.; An, J.S.; Cardo, D.M.; Cookson, S.T.; Holmes, C.E.; Antunes, M.B.; de Melos Filho, D.A.; Lyra, T.M.; Barreto, V.S.; Azevedo, S.M.; Jarvis, W.R. (1998) *New Engl. J. Med.* 338, 873 – 878.
- [64] Pouria, S.; de Andrade, A.; Barbosa, J.; Cavalcanti, R.; Barreto, V.; Ward, C.; Presier, W.; Poon, G.; Neild, G.; Codd, G. (1998) *Lancet* 352, 21 – 26.
- [65] Anadón, A.; Martínez-Larrañaga, M.R.; Martínez, M.A. (1999) Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal. *Industria Farmacéutica*. Enero/Febrero.
- [66] Versión consolidada de los anexos I a IV del Reglamento 2377/90 del Consejo actualizada el 25-11-2002.
- [67] Reglamento 470/2009/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) nº 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo.

- 
- [68] Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de **2001** por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios.
- [69] Reglamento 726/2004/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de **2004** por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos.
- [70] Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión, de 22 de diciembre de **2009**, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea L15*, de 20-01-2010.
- [71] Andersen, S.A.; Yeaton Woo, R.W.; Crawford, L.M. (**2001**) *Food Control* 12, 13 - 25.
- [72] Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de **2000**, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L327*, de 22-12-2000.
- [73] Decisión 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de **2001**, por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE.
- [74] Directiva 98/83/EC del Consejo, de 3 de noviembre de **1998** relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. *Diario Oficial de la Unión Europea L330*, de 05-12-1998.
- [75] Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de **1991**, relativa al tratamiento de las aguas residuales urbanas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L135*, de 30-05-1991.
- [76] Directiva 98/15/CE de la Comisión, de 27 de febrero de **1998**, por la que se modifica la Directiva 91/271/CEE del Consejo en relación con determinados requisitos establecidos en su anexo I. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L67/29*, de 07-03-1998.
- [77] Directiva 2006/118/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de diciembre de **2006**, relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L372*, de 27-12-2006.
- [78] Decisión 2004/248/CE de la Comisión, de 10 de marzo de **2004**, relativa a la no inclusión de la atrazina en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE del Consejo y a

- la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan esta sustancia activa. *Diario Oficial de la Unión Europea* L78, de 16-03-2004.
- [79] Decisión 2004/247/CE de la Comisión, de 10 de marzo de 2004, relativa a la no inclusión de la simazina en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE del Consejo y a la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan esta sustancia activa. *Diario Oficial de la Unión Europea* L78, de 16-03-2004.
- [80] US EPA (2009) National Primary Drinking Water Regulations.
- [81] Bécares, E.; Martín, J.; Hijosa, M.; Sidrach-Cardona, R. (2011) *Seguridad y medio ambiente* 124, 32 - 43.
- [82] Torres Manrique, C. (2012) La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Discurso leído en el acto de su recepción académica. Academia de Farmacia "Reino de Aragón".
- [83] Marti, E.; Balcázar, J.L. (2012) *Clin. Microbiol. Infect.* 18, E366 - E368.
- [84] WHO (1998) *Guidelines for Drinking water Quality: Addendum vol 2: Health Criteria and other supporting information*. 2ª Ed., Ginebra.
- [85] Fawell, J.K.; James, C.P.; James, H.A. (1994) Report N° FR0359/2/DoE 3, *FWR Reports Catalogue*, Marlow.
- [86] WHO (2003) Cyanobacterial toxins: microcystin-LR in drinking water. WHO/SDE/WSH/03.04/57.
- [87] Real Decreto 140/2003 por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.
- [88] Directiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a la gestión de la calidad de las aguas de baño y por la que se deroga la Directiva 76/160/CEE.
- [89] Real Decreto 1341/2007 sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño.
- [90] <http://www.smartcities.es/>
- [91] El Grupo Bridgestone gana el premio "A la Tecnología del Año en Neumáticos 2012", con la tecnología CAIS (2012) <http://www.bridgestone.es/noticias/> (24-02-2012)
- [92] Ortega Ruiz de Apocada, F. (2006) Biosensores y biochips: Herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. Discurso para su ingreso como Académico de Número. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia.
- [93] Turner, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S. (1987). *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford. 770p.
- [94] Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. (1991) *Pure Appl. Chem.* 63, 1247 - 1250.

- [95] Janata, J.; Josowicz, M.; DeVaney, D.M. (1994) *Anal. Chem.* 66, 207R – 228R.
- [96] Benito-Peña, M.E. (2006) Tesis Doctoral, *Universidad Complutense de Madrid*.
- [97] González-Rumayor, V.; García-Iglesia, E.; Ruiz-Galán, O.; Gago-Cabezas, L. (2005) Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. CEIM/Dirección General de Universidades e Investigación.
- [98] Kissinger, P.T. (2005) *Biosens. Bioelectron.* 20, 2512 – 2516.
- [99] Kissinger, P.T. (1997) *Curr. Separation* 16, 101 – 103.
- [100] La Ferré Urgell, M. (2003) Tesis Doctoral, *Universidad de Barcelona*.
- [101] Penalva Villegas, J. (2000) Tesis Doctoral, *Universidad Politécnica de Valencia*.
- [102] González Segura, A. (2004) *Isagogé 1*, 20 – 23.
- [103] Sapsford, K.; Taitt, C.R.; Ligler, F.S. (2008) Planar waveguides for fluorescence biosensors, en: *Optical Biosensors: Today and Tomorrow*. 2ª Eds. Ligler, F.S.; Taitt, C.R., Elsevier B.V., Amsterdam.
- [104] Mehrvar, M.; Bis, C.; Scharer, J.M.; Moo-Young, M.; Luong, J.H. (2000) *Anal. Sci.* 16, 677 – 692.
- [105] Pérez-Conde, C. (1996) La medida de la radiación electromagnética, en: *Sensores ópticos*. Ed. Universitat de València, Valencia.
- [106] Schasfoort, R.B.M.; McWhirter, A. (2008) SPR Instrumentation, en: *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Schasfoort, R.B.M.; Tudos, A.J.; RCS Publishing, Cambridge.
- [107] Gómez Cardona, N.D. (2011) Tesis Doctoral. *Universidad Nacional de Colombia*.
- [108] Homola, J.; Lu, H.B.B.; Nenninger, G.G.; Dostálek, J.; Yee, S.S. (2001) *Sens. Actuators B* 76, 403 – 410.
- [109] Hegnerová, K.; Bocková, M.; Vaisocherová, H.; Křištofiková, Z.; Říčný, J.; Řípová, D.; Homola, J. (2009), *Sens. Actuators B* 139, 69 – 73.
- [110] Homola, J.; Dostálek, J.; Chen, S.; Rasooly, A.; Jiang, S.; Yee, S.S. (2002) *Int. J. Food Microbiol.* 75, 61 – 69.
- [111] Ligler, F.S.; Sapsford, K.E.; Golden, J.P.; Shriver-Lake, L.C.; Taitt, C.R.; Dyer, M.A.; Barone, S.; Myatt, C.J. (2007) *Anal. Sci.* 23, 5 – 10.
- [112] Taitt, C.R.; Shriver-Lake, L.C.; Ngundi, M.M.; Ligler, F.S. (2008) *Sensors* 8, 8361 – 8377.
- [113] Marco, P.M.; Gee, S.; Hammock, B.D. (1995) *Trends Anal. Chem.* 14, 341 – 349.
- [114] Roca, P.; Oliver, J.; Rodríguez, A.M. (2003) Técnicas inmunoquímicas, en: *Bioquímica. Técnicas y Métodos*. Irurzun, A. Feduchi, E.; Ed. Hélice, Madrid.

- [115] Rastrelli, L.; Totaro, K.; De Simone, F. (2002) *Food Chem.* 79, 303 – 305.
- [116] Hock, B. (1997) *Anal. Chim. Acta* 347, 177 – 186.
- [117] Hoogenboom, H.R. (2005) *Nature Biotechnol.* 23, 1105 – 1116.
- [118] Kramer, K.; Fiedler, M.; Skerra, A.; Hock, B. (2002) *Biosens. Bioelectron.* 17, 305 – 313.
- [119] Leivo, J.; Chappuis, C.; Lamminmäki, U.; Lövgren, T.; Vehniäinen, M. (2011) *Anal. Biochem.* 409, 14 – 21.
- [120] Wen, K.; Nölke, G.; Schillberg, S.; Wang, Z.; Zhang, S.; Wu, C.; Jiang, H.; Meng, H.; Shen, J. (2012) *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2771 – 2783.
- [121] Gomes, F.B.M.B.; Riedstra, S.; Ferreira, J.P.M. (2010) *J. Immunol. Methods* 358, 17 – 22.
- [122] Stead, D.A. (2000) *J. Chromatogr. B* 747, 69 – 93.
- [123] Mello, L.D.; Kubota, L.T. (2002) *Food Chem.* 77, 237 – 256.
- [124] North, S.H.; Lock, E.H.; Taitt, C.R.; Walton, S.G. (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 925 – 933.
- [125] Lu, B.; Smyth, M.R.; O’Kennedy, R. (1996) *Analyst* 121, 29R – 32R.
- [126] Van der Merwe, P.A. (2001) Surface Plasmon Resonance en: *Protein–Ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry*. Harding, S.; Chowdhry, P.Z. (Eds). Practical Approach series, Oxford University Press.
- [127] Wink, Th.; van Zuilen, S.J.; Bult, A.; van Bennekom, W.P. (1997) *Analyst* 122, 43R – 50R.
- [128] Chaki, N.K.; Vijayamohan, K. (2002) *Biosens. Bioelectron.* 17, 1 – 12.
- [129] Guo, Z.; Jennings, H. (2001) *Methods Mol. Med.* 66, 49 – 54.
- [130] Pineda Solas, V. (2005) *Rev. Pediatr. Aten. Primaria.* 7, S65 – S74.
- [131] Benichou, A.; Aserin, A.; Garti, N. (2002) *J. Disper. Sci. Technol.* 23, 93 – 123.
- [132] Yadav, M.P.; Parris, N.; Johnston, D.B.; Onwulata, C.I.; Hicks, K.B. (2010) *Carbohydr. Polym.* 81, 476 – 483.
- [133] Akhtar, M.; Dickinson, E. (2003) *Colloids Surf. B* 31, 125 – 132.
- [134] Long, F.; Shi, H.C.; He, M.; Sheng, J.W.; Wang, J.F. (2009) *Anal. Chim. Acta* 649, 123 – 127.
- [135] Zeck, A.; Eikenberg, A.; Weller, M.G.; Niessner, R. (2001) *Anal. Chim. Acta* 441, 1 – 13.

- [136] Chianella, I.; Piletsky, S.A.; Tothill, I.E.; Chen, B.; Turner, A.P.F. (2003) *Biosens. Bioelectron.* 18, 119 – 127.
- [137] Long, F.; He, M.; Zhu, A.N.; Shi, H.C. (2009) *Biosens. Bioelectron.* 24, 2346 – 2351.
- [138] Gascón, J.; Oubiña, A.; Ballesteros, B.; Barceló, D.; Camps, F.; Marco, M.P.; González-Martínez, M.A.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, A. (1997) *Anal. Chim. Acta* 347, 149 – 162.
- [139] Tudorache, M.; Co, M.; Lifgren, H.; Emnéus, J. (2005) *Anal. Chem.* 77, 7156 – 7162.
- [140] Tudorache, M.; Emnéus, J. (2006) *Biosens. Bioelectron.* 21, 1513 – 1520.
- [141] Zwir-Ferenc, A.; Biziuk, M. (2006) *Polish J. of Environ. Stud.* 15, 677 – 690.
- [142] Agüete, E.C.; Gago-Martínez, A.; Leão, J.M.; Rodríguez-Vázquez, J.A.; Menàrd, C.; Lawrence, J.F. (2003) *Talanta* 59, 697 – 705.
- [143] Seifrtová, M.; Aufartová, J.; Vytlačilová, J.; Pena, A.; Solich, P.; Nováková, L. (2010) *J. Sep. Sci.* 33, 2094 – 2108.
- [144] Seifrtová, M.; Pena, A.; Lino, C.M.; Solich, P. (2008) *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 799 – 805.
- [145] Benito-Peña, E.; Urraca, J.L.; Sellergren, B.; Moreno-Bondi, M.C. (2008) *J. Chromatogr. A* 1208, 62 – 70.
- [146] Chen, L.; Zhang, X.; Xu, Y.; Du, X.; Sun, X.; Sun, L.; Wang, H.; Zhao, Q.; Yu, A.; Zhang, H.; Ding, L. (2010) *Anal. Chim. Acta* 662, 31 – 38.
- [147] Rodríguez, E.; Navarro-Villoslada, F.; Benito-Peña, E.; Marazuela, M.D.; Moreno-Bondi, M.C. (2011) *Anal. Chem.* 83, 2046 – 2055.
- [148] García-Galán, M.J.; Díaz-Cruz, M.S.; Barceló, D. (2010) *J. Hydrol.* 383, 30 – 38.
- [149] Masqué, N.; Marcé, R.M.; Borrull, F. (2001) *Trends Anal. Chem.* 20, 477 – 486.
- [150] Chapuis, F.; Pichon, V.; Lanza, F. (2003) *J. Chromatogr. A* 999, 23 – 33.
- [151] Turiel, E.; Martín-Esteban, A.; Fernández, P.; Pérez-Conde, C.; Cámara, C. (2001) *Anal. Chem.* 73, 5133 – 5141.
- [152] Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Herrero-Hernández, E. (2005) *J. Chromatogr. A* 1085, 199 – 206.
- [153] Chianella, I.; Lotierzo, M.; Piletsky, S.A.; Tothill, I.E.; Chen, B.; Karim, K.; Turner, A.P.F. (2002) *Anal. Chem.* 74, 1288 – 1293.
- [154] Pichon, V.; Chen, L.; Hennion, M.C.; Daniel, R.; Martel, A.; Le Goffic, F.; Abián, J.; Barceló, D. (1995) *Anal. Chem.* 67, 2451 – 2460.

- [155] Lawrence, J.F.; Ménard, C.; Hennion, M.C.; Pichon, V.; LeGoffic, F.; Durand, N. (1996) *J. Chromatogr. A* 752, 147 – 154.
- [156] Lawrence, J.F.; Menard, C. (2001) *J. Chromatogr. A* 922, 111 – 117.
- [157] Aranda-Rodriguez, R.; Kubwabo, C.; Benoit, F.M. (2003) *Toxicon* 42, 587 – 599.
- [158] Kondo, F.; Ito, Y.; Oka, H.; Yamada, S.; Tsuji, K.; Imokawa, M.; Niimi, Y.; Harada, K.; Ueno, Y.; Miyazaki, Y. (2002) *Toxicon* 40, 893 – 899.
- [159] Hu, X.; Mu, L.; Wen, J.; Zhou, Q. (2012) *J. Hazard. Mater.* 213 – 214, 387 – 392.
- [160] Picó, Y.; Fernández, M.; Ruiz, M.J.; Font, G. (2007) *J. Biochem. Bioph. Meth.* 70, 117 – 131.
- [161] Richardson, S.D. (2007) *Anal. Chem.* 79, 4295 – 4324.
- [162] Mitani, K.; Kataoka, H. (2006) *Anal. Chim. Acta* 562, 16 – 22.
- [163] Montesdeoca Esponda, S.; Torres Padrón, M.E.; Sosa Ferrera, Z.; Santana Rodríguez, J.J. (2009) *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 927 – 935.
- [164] Gonçalves, C.; Alpendurada, M.F. (2004) *J. Chromatogr. A* 1026, 239 – 250.
- [165] Lambropoulou, D.A.; Konstantinou, I.K.; Albanis, T.A. (2002) *J. AOAC Int.* 85, 486 – 493.
- [166] Huang, S.D.; Huang, H.I.; Sung, Y.H. (2004) *Talanta* 64, 887 – 893.
- [167] Frías, S.; Rodríguez, M.A.; Conde, J.E.; Pérez-Trujillo, J.P. (2003) *J. Chromatogr. A* 1007, 127 – 135.
- [168] Poon, K.F.; Lam, M.H.; Lam, P.K.S.; Wong, B.S.F. (2001) *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1648 – 1655.
- [169] Zhao, Y.Y.; Hrudey, S.; Li, X.F. (2006) *J. Chromatogr. Sci.* 44, 359 – 365.
- [170] Ammerman, J.L.; Aldstadt III, J.H. (2009) *Microchim. Acta* 164, 185 – 196.
- [171] Rezaee, M.; Assadi, Y.; Milani Hosseini M.R.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S. (2006) *J. Chromatogr. A* 1116, 1 – 9.
- [172] Yan, H.; Wang, H.; Qin, X.; Liu, B.; Dua, J. (2011) *J. Pharm. Biomed.* 54, 53 – 57.
- [173] Pavagadhi, S.; Basheer, C.; Balasubramanian, R. (2011) *Anal. Chim. Acta* 686, 87 – 92.
- [174] Nagaraju, D.; Huang, S.D. (2007) *J. Chromatogr. A* 1161, 89 – 97.
- [175] Sanagi, M.M.; Abbas, H.H.; Ibrahim, W.A.W.; Aboul-Enien, H.Y. (2012) *Food Chem.* 133, 557 – 562.
- [176] Audunsson, G. (1986) *Anal. Chem.* 58, 2714 – 2723.

- [177] Thordarson, E.; Pálmarsdóttir, S.; Mathiasson, L.; Jönsson, A. (1996) *Anal. Chem.* 68, 2559 – 2563.
- [178] Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E. (1999) *Anal. Chem.* 71, 2650 – 2656.
- [179] Ramos Payán, M.; Bello López, M.A.; Fernández-Torres, R.; Ocaña González, J.A.; Callejón Mochón, M. (2011) *J. Pharm. Biomed.* 55, 332 – 341.
- [180] Shen, G.; Lee, H.K. (2002) *Anal. Chem.* 74, 648 – 654.
- [181] Portugal, F.C.M.; Pinto, M.L.; Nogueira, J.M.F. (2008) *Talanta* 77, 765 – 773.
- [182] Camino-Sánchez, F.J.; Zafra-Gómez, A.; Cantarero-Malagón, S.; Vilchez, J.L. (2012) *Talanta* 89, 322 – 334.
- [183] Sanchez-Ortega, A.; Unceta, N.; Gómez-Caballero, A.; Sampedro, M.C.; Akesolo, U.; Goicolea, M.A.; Barrio, R.J. (2009) *Anal. Chim. Acta* 641, 110 – 116.
- [184] Huang, X.; Qiu, N.; Yuan, D.; Lin, Q. (2010) *J. Chromatogr. A* 1217, 2667 – 2673.
- [185] Górecki, T.; Namieśnik, J. (2002) *Trends Anal. Chem.* 21, 276 – 291.
- [186] Kot-Wasik, A.; Zabiega, B.; Urbanowicz, M.; Dominiak, E.; Wasik, A. (2007) *Anal. Chim. Acta* 602, 141 – 163.
- [187] Seethapathy, S.; Górecki, T.; Li, X. (2008) *J. Chromatogr. A* 1184, 234 – 253.
- [188] Kohoutek, J.; Babica, P.; Bláha, L.; Marsálek, B. (2008) *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1167 – 1172.
- [189] Kohoutek, J.; Marsálek, B.; Bláha, L. (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 823 – 828.
- [190] Kudela, R.M. (2011) *Harmful Algae* 11, 117 – 125.
- [191] Miller, M.A.; Kudela, R.M.; Mekebri, A.; Crane, D.; Oates, S.C.; Tinker, M.T.; Staedler, M.; Miller, W.A.; Toy-Choutka, S.; Dominik, C.; Hardin, D.; Langlois, G.; Murray, M.; Ward, K.; Jessup, D.A. (2010) *PLoS One* 5, e12576 – e12586.
- [192] Miège, C. Budzinski, H. Jacquet, R.; Soulier, C.; Pelte, T.; Coquery, M. (2010) *J. Environ. Monit.* 14, 626 – 635.
- [193] Nyoni, H.; Chimuka, L.; Vrana, B.; Cukrowska, E. (2011) *Anal. Chim. Acta* 694, 75 – 82.
- [194] Mekebri, A.; Blondina, G.J.; Crane, D.B. (2009) *J. Chromatogr. A* 1216, 3147 – 3155.
- [195] Amé, M.V.; Galanti, L.N.; Menone, M.L.; Gerpe, M.S.; Moreno, V.J.; Wunderlin, D.A. (2010) *Harmful Algae* 9, 66 – 73.
- [196] Segura, P.A.; Gagnon, C.; Sauvé, S. (2007) *Anal. Chim. Acta* 604, 147 – 157.



- [197] Pozo, O.J.; Guerrero, C.; Sancho, J.V.; Ibáñez, M.; Pitarch, E.; Hogendoorn, E.; Hernández, E. (2006) *J. Chromatogr. A* 1103, 83 – 93.
- [198] Yudthavorasit S.; Chiao Chan C.; Leepipatpiboon, N. (2011) *Microchim. Acta* 172, 39 – 49.
- [199] Na, G.; Gu, J.; Ge, L.; Zhang, P.; Wang, Z.; Liu, C.; Zhang, L. (2011) *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 29, 1093 – 1102.
- [200] Kotrikla, A.; Gatidou, G.; Lekkas, T.D. (2006) *J. Env. Sci. Health B* 41, 135 – 144.
- [201] Zhou, Q.X.; Wang, W.D.; Xiao, J.P.; Wang, J.H.; Liu, G.G.; Shi, Q.Z.; Guo, G.L. (2006) *Microchim. Acta* 152, 215 – 224.
- [202] Ma, W.T.; Jiang, G.B.; Cai, Z.W. (2005) *Int. J. Env. Anal. Chem.* 85, 1117 – 1125.
- [203] Tran, A.T.K.; Hyne, R.V.; Doble, P. (2007) *Chemosphere* 67, 944 – 953.
- [204] Stobb, K.; Singer, H.P.; Goetz, C.W.; Ruff, M.; Mueller, S.R. (2005) *J. Chromatogr. A* 1097, 138 – 147.
- [205] Zarpon, L.; Abate, G.; dos Santos, L.B.O.; Masini, J.C. (2006) *Anal. Chim. Acta* 579, 81 – 87.
- [206] Katsumata, H.; Kaneco, S.; Suzuki, T.; Ohta, K. (2006) *Anal. Chim. Acta* 577, 214 – 219.
- [207] Zhao, G.; Song, S.; Wang, C.; Wu, Q.; Wang Z. (2011) *Anal. Chim. Acta* 708, 155 – 159.
- [208] Zhao, R.S.; Yuan, J.P.; Jiang, T.; Shi, J.B.; Cheng, C.G. (2008) *Talanta* 76, 956 – 959.
- [209] Boonjob, W.; Miró, M.; Segundo, M.A.; Cerdà, V. (2011) *Anal. Chem.* 83, 5237 – 5244.
- [210] Boonjob, W.; Yu, Y.; Miró, M.; Segundo, M.A.; Wang, J.; Cerdà, V. (2010) *Anal. Chem.* 82, 3052 – 3060.
- [211] Hernando, M.D.; Mezcuca, M.; Suárez-Bárcena, J.M.; Fernández-Alba, A.R. (2006) *Anal. Chim. Acta* 562, 176 – 184.
- [212] Durfin Merfis, I.; Galeano Diaz, T.; Salinas López, E.; Rodríguez Cáceres, M.I. (2000) *Chromatographia* 51, 163 – 166.
- [213] Plakas, S.M.; El Said, K.R.; Musser, S.M (2000) *Aquaculture* 187, 1 – 14.
- [214] Intorre, L.; Cecchini, S.; Bertini, S.; Cognetti Varriale, A.M.; Soldani, G.; Mengozzi, G. (2000) *Aquaculture* 182, 49 – 59.
- [215] Volmer, D.A.; Mansoori, B.; Locke, S.J. (1997) *Anal. Chem.* 69, 4143 – 4155.

- [216] Schilling, J.B.; Cepa, S.P.; Menacherry, S.D.; Bavda L.T.; Heard, B.M.; Stockwell, B.L. (1995) *Anal. Chem.* 68, 1905 – 1909.
- [217] Hermo, M.P.; Nemutlu, E.S.; Barrón, D.; Barbosa, J. (2008) *Anal. Chim. Acta* 613, 98 – 107.
- [218] Lara, F.J.; García-Campaña, A.M.; Alés-Barrero, F.; Bosque-Sendra, J.M.; García-Ayuso, L.E. (2006) *Anal. Chem.* 78, 7665 – 7673.
- [219] Gigosos, P.G.; Revesado, P.R.; Cadahía, O.; Fente, C.A.; Vazquez, B.I.; Franco, C.M.; Cepeda, A (2000) *J. Chromatogr. A* 871, 31 – 36.
- [220] Chu, P.S.; Wang, R.C.; Chu, H.V. (2002) *J. Agric. Food Chem.* 50, 4452 – 4455.
- [221] Lolo, M.; Pedreira, S.; Fente, C.; Vázquez, B.I.; Franco, C.M.; Cepeda, A. (2003) *Anal. Chim. Acta* 480, 123 – 130.
- [222] Schneider, M.J.; Donoghue, D.J. (2003) *Anal. Chim. Acta* 483, 39 – 49.
- [223] Shim, J.H.; Lee, M.H.; Kim, M.R.; Lee, C.J.; Kim, S.; (2003) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1342 – 1348.
- [224] Bogialli, S.; D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Innocenti, G.; Laganá, A.; Pacchiarotta, T. (2007) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 2833 – 2842.
- [225] Hermo, M.P.; Barrón, D.; Barbosa, J. (2008) *J. Chromatogr. A* 1201, 1 – 14.
- [226] Clemente, M.; Hermo, M.P.; Barrón, D.; Barbosa, J. (2006) *J. Chromatogr. A* 1135, 170 – 178.
- [227] Baillac, S.; Barrón, D.; Barbosa, J. (2006) *Anal. Chim. Acta* 580, 163 – 169.
- [228] Hermo, M.P.; Barrón, D.; Barbosa, J. (2006) *J. Chromatogr. A* 1104, 132 – 139.
- [229] Yan, H.; Qiao, F.; Ho, K. (2007) *Anal. Chem.* 79, 8242 – 8248.
- [230] Wang, S.; Mu, H.; Bai, Y.; Zhang, Y.; Liu, H. (2009) *J. Chromatogr. B* 877, 2961 – 2966.
- [231] Christodoulou, E.; Samanidow, V.; Papadoyannis, I.N. (2007) *J. Chromatogr. B* 859, 246 – 255.
- [232] Hermo, M.P.; Barrón, D.; Barbosa, J. (2005) *Anal. Chim. Acta* 539, 77 – 82.
- [233] Xu, H.; Chen, L.; Sun, L.; Sun, X.; Du, X.; Wang, J.; Wang, T.; Zeng, Q.; Wang, H.; Xu, Y.; Zhang, X.; Ding L. (2011) *J. Sep. Sci.* 34, 142 – 149.
- [234] Xu, H.; Wang, T.; Zhao, Q.; Zeng, Q.; Wang, H.; Xu, Y.; Zhang, X.; Wang, F.; Ding, L. (2011) *Chromatographia* 74, 267 – 274.
- [235] Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Revilla-Ruiz, P.; Hernández-Méndez, J. (2005) *J. Chromatogr. A* 1089, 1 – 17.

- [236] Rodríguez, E.; Navarro Villoslada, F.; Moreno-Bondi, M.C.; Marazuela, M.D. (2010) *J. Chromatogr. A* 1217, 605 – 613.
- [237] Pecorelli, I.; Galarini, R.; Bibi, R.; Floridi, A.; Casciarri, E.; Floridi, A. (2003) *Anal. Chim. Acta* 483, 81 – 89.
- [238] Yu, H.; Tao, Y.; Chen, D.; Pan, Y.; Liu, Z.; Wang, Y.; Huang, L.; Dai, M.; Peng, D.; Wang, X.; Yuan, Z. (2012) *J. Chromatogr. B* 885 – 886, 150 – 159.
- [239] Rubies, A.; Vaquerizo, R.; Centrich, F.; Compañó, R.; Granados, M.; Prat, M.D. (2007) *Talanta* 72, 269 – 276.
- [240] Cinquina, A.L.; Roberti, P.; Giannetti, L.; Longo, F.; Draisci, R.; Fagiolo, A.; Brizioli, N.R. (2003). *J. Chromatogr. A* 987, 221 – 226.
- [241] Van Hoof, N.; De Wash, K.; Okerman, L.; Reybroeck, W.; Poelmans, S.; Noppe, H.; De Brabander, H. (2005) *Anal. Chim. Acta* 529, 265 – 272.
- [242] Tang, Q.; Yang, T.; Tan, X.; Luo, J. (2009) *J. Agric. Food Chem.* 57, 4535 – 4539.
- [243] Samanidou, V.F.; Christodoulou, E.A.; Papadoyannis, I.N. (2005) *J. Sep. Sci.*, 28, 555 – 565.
- [244] Toussaint, B.; Chedin, M.; Bordin, G.; Rodriguez, A.R. (2005) *J. Chromatogr. A* 1088, 32 – 39.
- [245] Roybal, J.; Walker, C.C.; Pfenning, A.P.; Turnipseed, S.B.; Storey, J.M.; Gonzales, S.A.; Hurlbut, J.A. (2002) *J. AOAC Int.* 85, 1293 – 1301.
- [246] Toussaint, B.; Bordin, G.; Janosi, A.; Rodriguez, A.R. (2002) *J. Chromatogr. A* 976, 195 – 206.
- [247] Holtzapple, C.K.; Buckley, S.A.; Stanker, L.H. (1999) *J. Agric. Food Chem.* 47, 2963 – 2968.
- [248] Holtzapple, C.K.; Buckley, S.A.; Stanker, L.H. (1999) *J. AOAC Int.* 82, 607 – 613.
- [249] Díaz-Alvarez, M.; Turiel, E.; Martín-Esteban, A. (2009) *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 899 – 905.
- [250] Rodríguez, E.; Moreno-Bondi, M.C.; Marazuela, M.D. (2011) *Food Chem.* 127, 1354 – 1360.
- [251] Qiao, F.; Sun, H. (2010) *J. Pharm. Biomed.* 53, 795 – 798.
- [252] SupelMIP SPE Fluoroquinolones Instruction Sheet, <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/supelmip/literature-and-references.html>
- [253] Bogialli, S.; D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Laganá, A.; Tramontana, G. (2009) *J. Chromatogr. A* 1216, 794 – 800.

- [254] Bogialli, S.; D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Laganà, A.; Nicolardi, S. (2008) *Food Chem.* 108, 354 – 360.
- [255] Krebber, R.; Hoffend, F.J.; Ruttman, F. (2009) *Anal. Chim. Acta* 637, 208 – 213.
- [256] Schneider, M.J., Donoghue, D.J. (2000) *J. AOAC Int.* 83, 1306 – 1312.
- [257] Schneider, M.J. (2001). *J. Chromatogr. Sci.* 39, 351 – 356.
- [258] Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.J. (2003) *J. AOAC Int.* 86, 412 – 431.
- [259] Stubbings, G.; Bigwood, T. (2009) *Anal. Chim. Acta* 637, 68 – 78.
- [260] Li, H.; Yin, J.; Liu, Y.; Shang, J. (2012) *J. Agric. Food Chem.* 60, 1722 – 1727.
- [261] Zhao, L.; Stevens, J. (2012) Determination of Quinolone Antibiotics in Bovine Liver Using Agilent Bond Elut QuEChERS Kits by LC/MS/MS. Application Note. *Agilent Technologies*.
- [262] Ahmed, F.A. (2001) *Trends Anal. Chem.* 20, 649 – 661.
- [263] da Silva, C.; de Lima, E.; Tavares, F. (2003) *J. Chromatogr. A* 1014, 109 – 116.
- [264] Muñoz, I.; Rosés, N. (2000) *Wat. Res.* 34, 2846 – 2848.
- [265] Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Paniagua-Marcos, P.H.; Hernández-Méndez, J. (2000) *J. Chromatogr. A* 869, 427 – 439.
- [266] Scutaru, B.; Giersch, T.; Cozmei, C.; Hock, B. (1998) *Toxicology* 127, 11 – 16.
- [267] Nam, K.S.; King, J.W. (1994) *J. Agric. Food Chem.* 42, 1469 – 1474.
- [268] Pensabene, J.W.; Fiddler, W.; Donoghue, D.J. (2000) *J. Agric. Food Chem.* 48, 1668 – 1672.
- [269] Curren, M.S.S.; King, J.W. (2001) *J. Agric. Food Chem.* 49, 2175 – 2180.
- [270] Przybylski, C.; Segard, C. (2009) *J. Sep. Sci.*, 32, 1858 – 1867.
- [271] Muldoon, M.T.; Stanker, L.H. (1997) *Anal. Chem.* 69, 803 – 808.
- [272] Zhang, D.; Xie, P.; Chen, J.; Dai, M.; Qiu, T.; Liu, Y.; Liang, G. (2009) *Chemosphere* 76, 974 – 981.
- [273] Lance, E.; Neffling, M.R.; Gérard, C.; Meriluoto, J.; Bormans, M. (2010) *Environ. Pollut.* 158, 674 – 680.
- [274] Lance, E.; Brient, L.; Bormans, M.; Gérard, C. (2006) *Aquat. Toxicol.* 79, 140 – 148.
- [275] Dai, M.; Xie, P.; Liang, G.; Chen, J.; Lei, H. (2008) *J. Chromatogr. B* 862, 43 – 50.

- [276] Chen, J.; Zhang, D.; Xie, P.; Wang, Q.; Ma, Z. (2009) *Sci. Total Environ.* 407, 3317 – 3322.
- [277] Amé, M.V.; Galanti, L.N.; Menone, M.L.; Gerpe, M.S.; Moreno, V.J.; Wunderlin, D.A. (2010) *Harmful Algae* 9, 66 – 73.
- [278] Peng, L.; Liu, Y.; Chen, W.; Liu, L.; Kent, M.; Song, L. (2010) *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1804 – 1811.
- [279] Chen, J.; Xie, P.; Zhang, D.W.; Ke, Z.X.; Yang, H. (2003) *Aquaculture* 261, 1026 – 1038.
- [280] Deblois, C.P.; Aranda – Rodriguez, R.; Giani, A.; Bird, D.F. (2008) *Toxicon* 51, 435 – 448.
- [281] Chen, J.; Xie, P. (2005) *Toxicon* 45, 615 – 625.
- [282] Kondo, F.; Matsumoto, H.; Yamada, S.; Ishikawa, N.; Ito, E.; Nagata, S.; Ueno, Y.; Suzuki, M.; Harada, K. (1996) *Chem. Res. Toxicol.* 9, 1355–1359.
- [283] Cazenave, J.; Wunderlin, D.A.; Bistoni, M.A.; Amé, M.V.; Krause, E.; Pflugmacher, S.; Wiegand, C. (2005) *Aquat. Toxicol.* 75, 178 – 190.
- [284] Sun, H.; Zhao, W.; He, P. (2008) *Chromatographia* 68, 425 – 429.
- [285] Zhang, H.; Ren, Y.; Bao, X. (2009) *J. Pharm. Biomed.* 49, 367 – 374.
- [286] Bucknall, S.; Silverlight, J.; Coldham, N.; Thorne, L.; Jackman, R. (2003) *Food Addit. Contam.* 20, 221 – 228.
- [287] Huet, A.C.; Charlier, C.; Tittlemier, S.A.; Singh, G.; Benrejeb, S.; Delahaut, P. (2006) *J. Agric. Food Chem.* 54, 2822 – 2827.
- [288] Haasnoot, W.; Gerçek, H.; Cazemier, G.; Nielen, M.W.F. (2007) *Anal. Chim. Acta* 586, 312 – 318.
- [289] Tittlemier, S.A.; Gélinas, J.M.; Dufresne, G.; Haria, M.; Querry, J.; Cleroux, C.; Ménard, C.; Delahaut, P.; Singh, G.; Fischer–Durand, N.; Godefroy, S.B. (2008) *Food Anal. Methods* 1, 28 – 35.
- [290] Jinqing, J.; Haitang, Z.; Zhixing, A.; Zhiyong, X.; Xuefeng, Y.; Huaguo, H.; Ziliang, W. (2012) *Physics Procedia* 25, 1829 – 1836.
- [291] Adrián, J.; Pasche, S.; Pinacho, D.G.; Font, H.; Diserens, J.M.; Sánchez–Baeza, F.; Granier, B.; Voirin, G.; Marco, P.M. (2009) *Trends Anal. Chem.* 8, 769 – 777.
- [292] Baranowska, I.; Barchanska, H.; Pacak, E. (2006) *Environ. Pollut.* 143, 206 – 211.
- [293] Gong, A.J.; Ye, C.M.; Lei, Z.F.; Liu, L.A. (1999) *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* 22, 2535 – 2545.

- [294] Rezić, I.; Horvat, A.J.M.; Babic, S.; Kastelan – Macan, M. (2005) *Ultrason. Sonochem.* 12, 477 – 481.
- [295] Bouaid, A.; Martin – Esteban, A.; Fernandez, P.; Cámara, C. (2000) *Fresenius' J. Anal. Chem.* 367, 291 – 294.
- [296] El-Saeid, M.H.; Kanu, I.; Anyanwu, E.C.; Saleh, M.A. (2005) *Sci. World J.* 5, 11 – 19.
- [297] Kaihara, A.; Yoshii, K.; Tsumura, Y.; Nakamura, Y.; Ishimitsu, S.; Tonogai, Y. (2000) *J. Health Sci.* 46, 336 – 342.
- [298] Pichon, V.; Aulard – Macler, E.; Oubihi, H.; Sassiati, E.; Hennion, M.C.; Caude, M. (1997) *Chromatographia* 46, 529 – 536.
- [299] Papilloud, S.; Haerdi, W. (1995) *Chromatographia* 40, 705 – 711.
- [300] Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Miranda-Cruz, E.; Domínguez-Álvarez, J.; Hernández-Méndez, J. (2007) *Electrophoresis* 28, 3606 – 3616.
- [301] Liu, W.; Lee, H.K. (1998) *Talanta* 45, 631 – 639.
- [302] Baranowska, I.; Barchanska, H.; Pyrsz, A. (2005) *Chemosphere* 60, 1590 – 1599.
- [303] Chapuis, F.; Pichon, V.; Lanza, F.; Sellergren, B.; Hennion, M.C. (2004) *J. Chromatogr. B* 804, 93 – 101.
- [304] Zhang, Y.; Liu, R.; Hu, Y.; Li, G. (2009) *Anal. Chem.* 81, 967 – 976.
- [305] Cacho, C.; Turiel, E.; Martín-Esteban, A.; Ayala, D.; Pérez-Conde, C. (2006) *J. Chromatogr. A* 1114, 255 – 262.
- [306] Mhaka, B.; Cukrowska, E.; Bui, B.T.S.; Ramström, O.; Haupt, K.; Tutu, H.; Chimuka, L. (2009) *J. Chromatogr. A* 1216, 6796 – 6801.
- [307] Hu, Y.; Li, J.; Hu, Y.; Li, G. (2010) *Talanta* 82, 464 – 470.
- [308] Ying Wang, Y.; You, J.; Ren, R.; Xiao, Y.; Gao, S.; Zhang, H.; Yu, A. (2010) *J. Chromatogr. A* 1217, 4241 – 4246.
- [309] Ferrer, C.; Gómez, M.J.; García-Reyes, J.F.; Ferrer, I.; Thurman, E.M.; Fernández-Alba A.R. (2005) *J. Chromatogr. A* 1069, 183 – 194.
- [310] Ramos, J.J.; Rial-Otero, R.; Ramos, L.; Capelo, J.L. (2008) *J. Chromatogr. A* 1212, 145 – 149.
- [311] Lombardo-Agüí, M.; García-Campaña, A.M.; Gámiz-Gracia, L.; Cruces-Blanco, C. (2012) *Talanta* 93, 193 – 199.
- [312] Mottier, P.; Hammel, Y.A.; Gremaud, E.; Guy, P.A. (2008) *J. Agric. Food Chem.* 56, 35 – 43.
- [313] Wutz, K.; Niessner, R.; Seidel, M. (2011) *Microchim. Acta* 173, 1 – 9.

- [314] Wu, X.L.; Mo, C.H.; Li, Y.W.; Wang, J.Y.; Su, Q.Y.; Huang, X.D.; Qu, X.L. (2011) *Environ. Sci.* 32, 1703 – 1709.
- [315] Hu, X.; Zhou, Q.; Luo, Y. (2010) *Environ. Pollut.* 158, 2992 – 2998.
- [316] Hammel, Y.A.; Schoutsen, F.; Martins, C.P.B. (2009) Application Note 465. Thermo Fisher Scientific Inc.
- [317] Zhou, J.; Xue, X.; Chen, F.; Zhang, J.; Li, Y.; Wu, L.; Chen, L.; Zhao, J. (2009) *J. Sep. Sci.* 32, 955 – 964.
- [318] Gilroy, D.J.; Kauffman, K.W.; Hall, R.A.; Huang, X.; ChU, F.S. (2000) *Environ. Health Perspect.* 108, 435 – 439.
- [319] Vinogradova, T.; Danaher, M.; Baxter, A.; Moloney, M.; Victory, D.; Haughey, S.A. (2011) *Talanta* 84, 638 – 643.
- [320] Koskinen, W.C., Banks, P.A. (2008) Soil Movement and Persistence of Triazine Herbicides, en: *The Triazine Herbicides: 50 years revolutionizing agriculture*. LeBaron, H.M.; McFarland, F.E.; Burnside, O.C.; Ed. Elsevier B.V., Amsterdam.
- [321] Zhang, X.L.; Martens, D.; Kramer, P.M.; Kettrup, A.A.; Liang, X.M. (2006) *J. Chromatogr. A* 1133, 112 – 118.
- [322] Burkhardt, M.R.; ReVello, R.C.; Smith, S.G.; Zaugg, S.D. (2005) *Anal. Chim. Acta* 534, 89 – 100.
- [323] Delgado-Moreno, L.; Peña, A.; Mingorance, M.D. (2009) *J. Hazard. Mater.* 162, 1121 – 1128.
- [324] Guardia Rubio, M.; Banegas Font, V.; Molina Díaz A.; Ayora Cañada, M.J. (2006) *Anal. Letters* 39, 835 – 850.
- [325] Shen, G.; Lee, H.K. (2003) *J. Chromatogr. A* 985, 167 – 174.
- [326] Mougin, C.; Dubroca, J.; Barriuso, E. (1996) *J. High Res. Chrom.* 19, 700 – 702.
- [327] McLaughlin, R.A.; Barringer, V.M.; Brady, J.F.; Yokley, R.A. (2008) Methods of Analysis for Triazine Herbicides and Their Metabolites, en: *The Triazine Herbicides: 50 years revolutionizing agriculture*. LeBaron, H.M.; McFarland, F.E.; Burnside, O.C.; Ed. Elsevier B.V., Amsterdam.
- [328] Mei, M.; Du, Z.X.; Cen, Y. (2011) *Chinese J. Anal. Chem.* 39, 1659 – 1664.
- [329] Teoa, C.C.; Tan, S.N.; Yong, J.W.H.; Hew, C.S.; Ong, E.S. (2010) *J. Chromatogr. A* 1217, 2484 – 2494.
- [330] Richter, P.; Sepúlveda, B.; Oliva, R.; Calderón, K.; Seguel, R. (2003) *J. Chromatogr. A* 994, 169 – 177.
- [331] Tajuddin, R.; Smith, R.M. (2005) *J. Chromatogr. A* 1084, 194 – 200.

- [332] Barriuso, E.; Koskinen, W.; Sadowoski, M.J. (2004) *J. Agric. Food Chem.* 52, 6552 – 6556.
- [333] Lerch, R.N.; Li, Y.X. (2001) *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 79, 167 – 183.
- [334] Camino-Sánchez, F.J.; Zafra-Gómez, A.; Pérez-Trujillo, J.P.; Conde-González, J.E.; Marques, J.C.; Vilchez, J.L. (2011) *Chemosphere* 84, 869 – 881.
- [335] Sukul, P.; Spiteller, M. (2007) *Rev. Environ. Contam. T.* 191, 131 – 162.
- [336] Picó, Y.; Andreu, V. (2007) *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1287 – 1299.
- [337] Karci, A.; Balcioglu, I.A. (2009) *Sci. Total Environ.* 407, 4652 – 4664.
- [338] Golet, E.M.; Strehler, A.; Alder, A.C.; Giger, W. (2002) *Anal. Chem.* 74, 5455 – 5462.
- [339] Turiel, E.; Martín-Esteban, A.; Tadeo, J.L. (2006) *Anal. Chim. Acta* 562, 30 – 35.
- [340] Gómez-Granados, F.; Codony, R.; Granados, M.; Prat, M.D. (2011) *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 91, 1353 – 1366.
- [341] Sturini, M.; Speltini, A.; Maraschi, F.; Rivagli, E.; Profumo, A. (2010) *J. Chromatogr. A* 1217, 7316 – 7322.
- [342] Morales-Muñoz, S.; Luque-García, J.L.; de Castro, L. (2004) *J. Chromatogr. A* 1059, 25 – 31.
- [343] Uslu, M.Ö.; Yediler, A.; Balcioglu, I.A.; Schulte-Hostede, S. (2008) *Water Air Soil Pollut.* 190, 55 – 63.
- [344] Christian, T.; Schneider, R.J.; Färber, H.A.; Skutlarek, D.; Meyer, M.T.; Goldbach, H.E. (2003) *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31, 36 – 44.
- [345] Turiel, E.; Martín-Esteban, A.; Tadeo, J.L. (2007) *J. Chromatogr. A* 1172, 97 – 104.
- [346] Chen, W.; Song, L.; Gan, N.; Li, L. (2006) *Environ. Pollut.* 144, 752 – 758.
- [347] Chen, W.; Li, L.; Gan, N.; Song, L. (2006) *Environ. Pollut.* 143, 241 – 246.
- [348] Seifrtová, M.; Aufartová, J.; Vytlačilová, J.; Pena, A.; Solich, P.; Nováková, L. (2010) *J. Sep. Sci.* 33, 527 – 535.
- [349] Spoof, L.; Karlsson, K.; Meriluoto, J. (2001) *J. Chromatogr. A* 909, 225 – 236.
- [350] Sousa, J.; Alves, G.; Fortuna, A.; Falcão, A. (2012) *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 93 – 129.
- [351] Liang, H.; Kays, M.B.; Sowinski, K.M. (2002) *J. Chromatogr. B* 772, 53 – 63.
- [352] Nemutlu, E.; Kir, S.; Özyüncü, Ö.; Bektaş, M.S. (2007) *Chromatographia* 66, 15 – 24.



- [353] Nguyen, H.A.; Grellet, J.; Ba, B.B.; Quentin, C.; Saux, M.C. (2004) *J. Chromatogr. B* 810, 77 – 83.
- [354] Jones, G.J.; Falconer, I.R.; Wilkins, R.M. (1995) *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10, 19 – 24.
- [355] Wicks, R.J.; Thiel, P.G. (1990) *Environ. Sci. Technol.* 24, 1413 – 1418.
- [356] Lawton, L.A.; Edwards, C.; Codd, G.A. (1994) *Analyst* 119, 1525 – 1530.
- [357] Liu, G.; Qian, Y.; Dai, S.; Feng, N. (2008) *Water Air Soil Pollut.* 192, 67 – 76.
- [358] De Maagd, P.G.J.; Hendriks, A.J.; Seinen, W.; Sijm, D.T.H.M. (1999) *Wat. Res.* 33, 677 – 680.
- [359] Nawrocki, J. (1997) *J. Chromatogr. A* 779, 29 – 71.
- [360] Wright, D.H.; Herman, V.K.; Konstantinides, F.N.; Rotschafer J.C. (1998) *J. Chromatogr. B* 709, 97 – 104.
- [361] Laban-Djurdjević, A.; Jelikić-Stankov, M.; Djurdjević, P. (2006) *J. Chromatogr. B* 844, 104 – 111.
- [362] Kim, B.H.; Choi, N.H.; Ok, J.H. (2002) *J. Chromatogr. Sci.* 40, 369 – 376.
- [363] Xu, W.; Chen, Q.; Zhang, T.; Cai, Z.; Jia, X.; Xie, Q.; Ren, Y. (2008) *Anal. Chim. Acta* 626, 28 – 36.
- [364] Wang, J.; Pang, X.; Ge, F.; Ma, Z. (2007) *Toxicon* 49, 1120 – 1128.
- [365] Gervais, G.; Brosillon, S.; Laplanche, A.; Helen, C. (2008) *J. Chromatogr. A* 1202, 163 – 172.
- [366] Nurmi, J.; Pellinen, J. (2011) *J. Chromatogr. A* 1218, 6712 – 6719.
- [367] Lacina, O.; Urbanova, J.; Poustka, J.; Hajslova, J. (2010) *J. Chromatogr. A* 1217, 648 – 659.
- [368] Gong, A.; Ye, C. (1998) *J. Chromatogr. A* 827, 57 – 63.
- [369] Okihashi, M.; Akutsu, K.; Obana, H.; Hori, S. (2000) *Analyst* 125, 1966 – 1969.
- [370] Bucheli, T.D.; Gruebler, F.C.; Müller, S.R.; Schwarzenbach, R.P. (1997) *Anal. Chem.* 69, 1569 – 1576.
- [371] Farber, H.; Nick, K.; Scholer, H. F. (1994) *Fresenius' J. Anal. Chem.* 350, 145 – 149.
- [372] Tang, W.; Jiang, G.; Cai, Z. (2005) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 85, 1117 – 1125.
- [373] Perreau, F.; Einhorn, J. (2006) *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 1449 – 1456.
- [374] Sabik, H.; Jeannot, R. (2006) *Methods in Biotechnology* 19, en: *Pesticide Protocols*. Martínez Bidal, J.L.; Garrido Frenich, A.; Ed. Humana Press Inc., New Jersey.

- [375] Navarro, S.; Oliva, J.; Barba, A.; García, C. (2000) *J. AOAC Int.* 83, 1239 – 1243.
- [376] Forcada, M.; Beltran, J.; López F.J.; Hernández, F. (2000) *Chromatographia* 51, 362 – 368.
- [377] Eisert, R.; Levsen, K. (1996) *J. Chromatogr. A* 737, 59 – 65.
- [378] Dallüge, J.; Hankemeier, T.; Vreuls, R.J.J.; Brinkman, U.A.T. (1999) *J. Chromatogr. A* 830, 377 – 386.
- [379] Djozan, D.; Farajzadeh, M.A.; Sorouraddin, S.M.; Baheri, T.; Norouzi, J. (2012) *Chromatographia* 75, 139 – 148.
- [380] Pfenning, A.P.; Munns, R.K.; Turnipseed, S.B.; Roybal, J.E.; Holland, D.C.; Long, A.R.; Plakas, S.M. (1996) *J AOAC Int.* 79, 1227 – 1235.
- [381] Sano, T.; Nohara, K.; Shiraishi F.; Kaya, K. (1992) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 49, 163 – 170.
- [382] Kaya, K.; Sano, T. (1999) *Anal. Chim. Acta* 386, 107 – 112.
- [383] McElhiney, J.; Lawton, L.A. (2005) *Toxicol. Applied Pharm.* 203, 219 – 230.
- [384] De La Vigne, U.; Jänchen, D.E.; Weber, W.H. (1991) *J. Chromatogr. A* 553, 489 – 496.
- [385] Hamada, M.; Wintersteiger, R. (2002) *J. Biochem. Biophys. Methods* 53, 229 – 239.
- [386] Tuzimski, T.; Soczewinski, E. (2002) *J. Chromatogr. A* 961, 277 – 283.
- [387] Kördel, W.; Wahle, U.; Knoche, H.; Hund, K. (1995) *Sci. Total Environ.* 171, 43 – 50.
- [388] Babić, S.; Petrović, M.; Kaštelan-Macan, M. (1998) *J. Chromatogr. A* 823, 3 – 9.
- [389] De Prado, R.; Lopez-Martinez, N.; Gonzalez-Gutierrez, J. (2000) *Pesticide Biochem. Physiol.* 67, 114 – 124.
- [390] Ojanperä, I.; Pelander, A.; Vuori, E.; Himberg, K.; Waris, M.; Niinivaara, K. (1995) *J. Planar Chromatogr.* 8, 69 – 72.
- [391] Pelander, A.; Ojanperä, I.; Lahti, K.; Niinivaara, K.; Vuori, E. (2000) *Water Res.* 34, 2643 – 2652.
- [392] Bober, K. (2008) *Anal. Letters* 41, 1909 – 1913.
- [393] Lanwang, P.; Chen, L.; Fan, Y.F. (2001) *J. AOAC Int.* 84, 684 – 688.
- [394] Choma, I.; Grenda, D.; Malinowska, I.; Suprynowicz, Z. (1999) *J. Chromatogr. B* 734, 7 – 14.
- [395] Juhel-Gaugain, M.; Abjean, J.P. (1998) *Chromatographia* 47, 101 – 104.

- [396] Shu, E.N.; Muko, K.N.; Ogbodo, S.O.; Maduka, I.C.; Ezeunala, M.N. (2007) *Biomed. Res.* 18, 135 – 138.
- [397] Pérez-Fernández, V.; Domínguez-Vega, E.; Crego, A.L.; García, M.A.; Marina, M.L. (2012) *Electrophoresis* 33, 127–146.
- [398] Barrón, D.; Jiménez-Lozano, E.; Bailac, S.; Barbosa, J. (2003) *Anal. Chim. Acta* 477, 21 – 27.
- [399] Barrón, D.; Jiménez-Lozano, E.; Bailac, S.; Barbosa, J. (2002) *J. Chromatogr. B* 767, 313 – 319.
- [400] Jiménez-Lozano, E.; Roy, D.; Barrón, D.; Barbosa, J. (2004) *Electrophoresis* 25, 65 – 73.
- [401] Hernández, M.; Borruall, F.; Calull, M. (2002) *Electrophoresis* 23, 506 – 511.
- [402] Sun, H.W.; He, P.; Lv, Y.K.; Liang, S.X. (2007) *J. Chromatogr. B* 852, 145 – 151.
- [403] Lara, F.J.; García-Campaña, A.M; Alés-Barrero, F.; Bosque-Sendra, J.M. (2008) *Electrophoresis* 29, 2117 – 2125.
- [404] Wang, L.; Wu, X.; Xie, Z. (2005) *J. Sep. Sci.* 28, 1143 – 1148.
- [405] Zhou, X.; Xing, D.; Zhu, D.; Tang, Y.; Jia, L. (2008) *Talanta* 75, 1300 – 1306.
- [406] Horstkotter, C.; Jiménez-Lozano, E.; Barrón, D.; Barbosa, J.; Blaschke, G., (2002) *Electrophoresis* 23, 3078 – 3083.
- [407] McCourt, J., Bordin, G., Rodríguez, A.R. (2003) *J. Chromatogr. A* 990, 259 – 269.
- [408] Juan-García, A.; Font, G.; Pico, Y. (2006) *Electrophoresis* 27, 2240 – 2249.
- [409] Juan-García, A.; Font, G.; Pico, Y. (2007) *Electrophoresis* 28, 4180 – 4191.
- [410] Frías-García, S., Sánchez, M.J., Rodríguez-Delgado, M.A. (2004) *Electrophoresis* 25, 1042 – 1050.
- [411] Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Domínguez-Álvarez, J.; Hernández-Méndez, J. (2000) *J. Chromatogr. A* 869, 451 – 461.
- [412] Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Miranda-Cruz, E.; Domínguez-Álvarez, J.; Hernández-Méndez, J. (2006) *J. Chromatogr. A* 1122, 194 – 201.
- [413] Cai, J.; El Rassi, Z. (1992) *J. Liq. Chromatogr.* 15, 1179 – 1192.
- [414] Tsai, C.Y., Chen, Y.R., Her, G.R. (1998) *J. Chromatogr. A* 813, 379 – 386.
- [415] Picó, Y.; Rodríguez, R.; Mañes, J. (2003) *Trends Anal. Chem.* 22, 133 – 151.
- [416] Islam, K.; Jha, S.K.; Chand, R.; Han, D.; Kim, Y.S. (2012) *Microelectron. Eng.* 97, 391 – 395.

- [417] Vasas, G.; Gáspár, A.; Páger, C.; Surányi, G.; Máthé, C.; Hamvas, M.M.; Borbely, G. (2004) *Electrophoresis* 25, 108–115.
- [418] Li, P.C.H.; Hu, S.; Lam, P.K.S. (1999) *Mar. Pollut. Bull.* 39, 250 – 254.
- [419] Sirén, H.; Jussila, M.; Liu, H.; Peltoniemi, S.; Sivonen, K.; Riekkola, M.L. (1999) *J. Chromatogr. A* 839, 203 – 215.
- [420] Gago-Martínez, A.; Piñeiro, N.; Aguete, E.C.; Vaquero, E.; Nogueiras, M.; Leão, J.M.; Rodríguez-Vázquez, J.A.; Dabek-Zlotorzynska, E. (2003) *J. Chromatogr. A* 992, 159 – 168.
- [421] Tong, P.; Zhang, L.; He, Y.; Tang, S.; Cheng, J.; Chen, G. (2010) *Talanta* 82, 1101 – 1106.
- [422] Okerman, L.; Noppe, H.; Cornet, V.; De Zutter, L. (2007) *Food Addit. Contam.* 24, 252 – 257.
- [423] Okerman, L.; Croubels, S.; De Baere, S.; Van Hoof, J.; De Backer, P.; De Brabander, H. (2001) *Food Addit. Contam.* 18, 385 – 393.
- [424] Ashwin, H.; Stead, S.; Caldow, M.; Sharman, M.; Stark, J.; de Rijk, A.; Keely, B.J. (2009) *Anal. Chim. Acta* 637, 241 – 246.
- [425] Sanz, D.; Mata, L.; Condón, S.; Sanz, M.A.; Razquin, P. (2011) *Food Anal. Methods* 4, 212 – 220.
- [426] Pikkemaat, M.G.; Mulder, P.P.J.; Elferink, J.W.A.; De Cocq, A.; Nielen, M.W.F.; Van Egmond, H.J. (2007) *Food Addit. Contam.* 24, 842 – 850.
- [427] Chung, H.H.; Lee, J.B.; Chung, Y.H.; Lee, K.G. (2009) *Food Chem.* 113, 297 – 301.
- [428] Althaus, R.; Berruga, M.I.; Montero, A.; Roca, M.; Molina, M.P. (2009) *Anal. Chim. Acta* 632, 156 – 162.
- [429] Pikkemaat, M.G. (2009) *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 893 – 905.
- [430] Gaudin, V.; Hedou, C.; Rault, A.; Verdon, E. (2010) *Food Addit. Contam.* 27, 935 – 952.
- [431] Gaudin, V.; Maris, P.; Fuselier, R.; Ribouchon, J.L.; Cadieu, N.; Raul, A. (2004) *Food Addit. Contam.* 21, 422 – 433.
- [432] Dang, P.K.; Degand, G.; Douny, C.; Ton, V.D.; Maghuin-Rogister, G.; Scippo, M.L. (2011) *Int. J. Food Sci. & Technol.* 46, 2070 – 2076.
- [433] Dang, P.K.; Degand, G.; Danyi, S.; Pierret, G.; Delahaut, P.; Tona, V.D.; Maghuin-Rogister, G.; Scippo, M.L. (2010) *Anal. Chim. Acta* 672, 30 – 39.
- [434] Pikkemaat, M.G.; Oostra-van Dijk, S.; Schouten, J.; Rapallini, M.; van Egmond, H.J. (2008) *Food Control* 19, 781 – 789.

- [435] Ferrini, A.M.; Mannoni, V.; Aureli, P. (2006) *Food Addit. Contam.* 23, 16 – 24.
- [436] Le Breton, M.H.; Savoy-Perroud, M.C.; Diserens, J.M. (2007) *Anal. Chim. Acta* 586, 280 – 283.
- [437] Stead, S.L.; Ashwin, H.; Richmond, S.F.; Sharman, M.; Langeveld, P.C.; Barendse, J.P.; Stark, J.; Keely, B.J. (2008) *Int. Dairy J.* 18, 3 – 11.
- [438] Gaudin, V.; Juhel-Gaugain, M.; Morétain, J.P.; Sanders, P. (2008) *Food Addit. Contam.* 25, 1451 – 1464.
- [439] Maršálek, B.; Luděk Bláha, L. (2004) *Environ. Toxicol.* 19, 310 – 317.
- [440] Drobniewska, A.; Tarczyńska, M.; Mankiewicz, J.; Jurczak, T.; Zalewski, M. (2004) *Environ. Toxicol.* 19, 416 – 420.
- [441] De Hoyos Alonso, C.; Villén de la Fuente, L.; Martín del Pozo, D.; Conde Bueno, L.; Alonso García, A.M.; González Ramos, M.E.; Verdugo Althofer, M.; Aviés García, J. (2008) *Ingeniería Civil* 151, 63 – 69.
- [442] Lambert, T.W.; Boland, M.P.; Holmes, C.F.B.; Hrudehy, S.E. (1994) *Environ. Sci. Technol.* 28, 753 – 755.
- [443] Xu, L.H.; Lam, P.K.S.; Chen, J.P.; Xu, J.M.; Wong, B.S.F.; Zhang, Y.Y.; Wu, R.S.S.; Harada, K.I. (2000) *Chemosphere* 41, 53 – 58.
- [444] Heresztyn, T.; Nicholson, B.C. (2001) *Water Res.* 35, 3049 – 3056.
- [445] Triantis, T.; Tsimeli, K.; Kaloudis, T.; Thanassoulas, N.; Lytras, E.; Hiskia, A. (2010) *Toxicon* 55, 979 – 989.
- [446] Bouaïcha, N.; Maatouk, I.; Vincent, G.; Levi, Y. (2002) *Food Chem. Toxicol.* 40, 1677 – 1683.
- [447] Chuang, J.C.; Van Emon, J.M.; Jones, R.; Durnford, J.; Lordo, R.A. (2007) *Anal. Chim. Acta* 583, 32 – 39.
- [448] Price R.G.; Baranowska, I.; Griffith, H.M.; Abuknesha, R.A.; Barchanska, H. (2006) *Biomarkers* 11, 291 – 305.
- [449] Deng, A.; Franek, M.; Kolar, V. (1999) *Food Agric. Immunol.* 11, 135 – 144.
- [450] Brena, B.M.; Arellano, L.; Rufo, C.; Last, M.S.; Montaña, J.; Cerni, E.E.; Gonzalez-Sapienza, G.; Last, J.A. (2005) *Environ. Sci. Technol.* 39, 3896 – 3903.
- [451] Maqbool, U.; Anwar-ul-Haq; Qureshi, M.J.; Iqbal, M.Z.; Hock, B.; Kramer, K. (2002) *J. Env. Sci. Health B* 37, 307 – 322.
- [452] Wittmann, C.; Hock, B. (1993) *J. Agric. Food Chem.* 41, 1421 – 1425.
- [453] Bushway, R.J.; Perkins, L.B.; Hurst, H.L. (1992) *Food Chem.* 43, 283 – 287.
- [454] Fránck, M.; Kolář, V.; Eremin, S.A. (1995) *Anal. Chim. Acta* 311, 349 – 356.

- [455] Cao, Z.; Meng, M.; Lu, S.; Xi, R. (2011) *Anal. Letters* 44, 1077 – 1084.
- [456] Jinqing, J.; Haitang, Z.; Ziliang, W. (2011) *Procedia Environ. Sci.* 8, 301 – 306.
- [457] Jiang, J.Q.; Zhang, H.T.; An, Z.X.; Zhang, X.J.; Chen, J.J.; Huang, H.G.; Wang, Z.L. (2012) *Adv. Mat. Res.* 345, 297 – 303.
- [458] Cui, J.; Zhang, K.; Huang, Q.; Yu, Y.; Peng, X. (2011) *Anal. Chim. Acta* 688, 84 – 89.
- [459] Sheng, J.W.; He, M.; Shi, H.C.; Qian, Y. (2006) *Anal. Chim. Acta* 572, 309 – 315.
- [460] McDermott, C.M.; Feola, R.; Plude, J. (1995) *Toxicon* 33, 1433 – 1442.
- [461] Sheng, J.W.; He, M.; Shi, H.C. (2007) *Anal. Chim. Acta* 603, 111 – 118.
- [462] Khreich, N.; Lamourette, P.; Renard, P.Y.; Clavé, G.; Fenaille, F.; Créminon, C.; Volland, H. (2009) *Toxicon* 53, 551 – 559.
- [463] Valkirs, G.E.; Barton, R.S. (1985) *Clin. Chem.* 31, 1427 – 1431.
- [464] Ballesteros, B.; Barceló, D.; Dankwardt, A.; Schneider, P.; Marco, M.P. (2003) *Anal. Chim. Acta* 475, 105 – 115.
- [465] Hendrickson, O.D.; Wärnmark – Surugiu, I.; Sitdikov, R.A.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B.; Danielsson, B. (2005) *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 85, 905 – 915.
- [466] Schulzea, P.A.; Capela, P.D.; Squillaceb, P.J.; Helselc, D.R. (1993) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 53, 307 – 319.
- [467] Sui, J.; Lin, H.; Cao, L.; Li, Z. (2009) *Food Agric. Immunol.* 20, 125 – 137.
- [468] Cao, L.; Sui, J.; Kong, D.; Li, Z.; Lin, H. (2011) *Food Anal. Methods* 4, 517 – 524.
- [469] Puchades, R.; Maquieira, A. (1996) *Crit. Rev. Anal. Chem.* 26, 195 – 218.
- [470] Gübitz, G.; Shellum, C. (1993) *Anal. Chim. Acta* 283, 421 – 428.
- [471] Krämer, P.; Schmid, R. (1991) *Biosens. Bioelectron.* 6, 239 – 243.
- [472] Önnarfjord, P.; Marko-Varga, G. (2000) *Chromatographia* 51, 199 – 204.
- [473] Fránek, M.; Deng, A.; Koláč, V. (2000) *Anal. Chim. Acta* 412, 19 – 27.
- [474] Hipólito-Moreno, A.; León-González, M.E.; Pérez-Arribas, L.V.; Polo-Díez, L.M. (1998) *Anal. Chim. Acta* 362, 187 – 192.
- [475] Ngom, B.; Guo, Y.; Wang, X.; Bi, D. (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 1113 – 1135.
- [476] Leuveringa, J.H.W.; Thala, P.J.H.M.; van der Waarta, M.; Schuur, A.H.W.M. (1980) *J. Immunoassay Immunochem.* 1, 77 – 91.

- [477] Zhao, Y.; Zhang, G.; Liu, Q.; Teng, M.; Yang, J.; Wang, J. (2008) *J. Agric. Food Chem.* 56, 12138 – 12142.
- [478] Zhu, Y.; Li, L.; Wang, Z.; Chen, Y.; Zhao, Z.; Zhu, L.; Wu, X.; Wan, Y.; He, F.; Shen, J. (2008) *J. Agric. Food Chem.* 56, 5469 – 5474.
- [479] Sheng, W.; Li, Y.; Xu, X.; Yuan, M.; Wang, S. (2011) *Microchim. Acta* 173, 307 – 316.
- [480] Zhi, A.M.; Li, B.B.; Liu, Q.T.; Hu, X.F.; Zhao, D.; Hou, Y.Z.; Deng, R.G.; Chai, S.J.; Zhang, G.P. (2010) *Food Agric. Immunol.* 21, 335 – 345.
- [481] Gabaldón, J.A.; Cascales, J.M.; Morias, S.; Maquieira, A.; Puchades, R. (2003) *Food Addit. Contam.* 20, 707 – 715.
- [482] Wittmann, C.; Bilitewski, U.; Giersch, T.; Kettling, U.; Schmid, R.D. (1996) *Analyst* 121, 863 – 869.
- [483] Mosiello, L.; Cremisini, C.; Segre, L.; Chiavarini, S.; Spanò, M.; Kimmel, T.; Bäumner, A.J.; Schmid, R.D. (1998) *J. Agric. Food Chem.* 46, 3847 – 3851.
- [484] Gabaldón, J.A.; Maquieira, A.; Puchades, R. (2002) *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 82, 133 – 144.
- [485] Na, Y.; Sheng, W.; Yuan, M.; Li, L.; Liu, B.; Zhang, Y.; Wang, S. (2012) *Microchim. Acta* 177, 177 – 184.
- [486] Zhang, F.; Yang, S.H.; Kang, T.Y.; Cha, G.S.; Nam, H.; Meyerhoff, M.E. (2007) *Biosens. Bioelectron.* 22, 1419 – 1425.
- [487] Tippkötter, N.; Stückmann, H.; Kroll, S.; Winkelmann, G.; Noack, U.; Scheper, T.; Ulber, R. (2009) *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 863 – 869.
- [488] Lawton, L.A.; Chambers, H.; Edwards, C.; Nwaopara, A.A.; Healy, M. (2010) *Toxicon* 55, 973 – 978.
- [489] Khreich, N.; Lamourette, P.; Lagoutte, B.; Ronco, C.; Franck, X.; Créminon, C.; Volland, H. (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 1733 – 1742.
- [490] Védrine, C.; Fabiano, S.; Tran-Minh, C. (2003) *Talanta* 59, 535 – 544.
- [491] Anh, T.M.; Dzyadevych, S.V.; Van, M.C.; Renault, N.J.; Duc, C.N.; Chovelon, J.M. (2004) *Talanta* 63, 365 – 370.
- [492] Campanella, L.; Bonanni, A.; Martini, E.; Todini, N.; Tomassetti, M. (2005) *Sens. Actuators B* 111 – 112, 505 – 514.
- [493] Campanella, L.; Dragone, R.; Lelo, D.; Martini, E.; Tomassetti, M. (2006) *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 915 – 921.
- [494] Torriero, A.; Salinas, E.; Raba, J.; Silber, J.J. (2006) *Biosens. Bioelectron.* 22, 109 – 115.

- [495] Torriero, A.A.J.; Ruiz-Díaz, J.J.; Salinas, E.; Marchevsky, E.J.; Sanz, M.I.; Raba, J. (2006) *Talanta* 69, 691 – 699.
- [496] Bertolino, F.A.; De Vito, I.E.; Messina, G.A.; Fernández, H.; Raba, J. (2011) *J. Electroanal. Chem.* 651, 204 – 210.
- [497] Campàs, M.; Szydłowska, D.; Trojanowicz, M.; Marty, J.L. (2007) *Talanta* 72, 179 – 186.
- [498] Shapiro, E.; Baneyx, F. (2007) *J. Biotechnol.* 132, 487 – 493.
- [499] Chen, Z.; Lu, M.; Zhuang, G.; Wang, H. (2011) *Anal. Chem.* 83, 3248 – 3251.
- [500] Bhalla, V.; Zazubovich, V. (2011) *Anal. Chim. Acta* 707, 184 – 190.
- [501] Touloupakis, E.; Giannoudi, L.; Piletsky, S.A.; Guzzella, L.; Pozzoni, F.; Giardi, M.T. (2005) *Biosens. Bioelectron.* 20, 1984 – 1992.
- [502] Nakamura, C.; Hasegawa, M.; Nakamura, N.; Miyake, J. (2003) *Biosens. Bioelectron.* 18, 599 – 603.
- [503] Peña-Vázquez, E.; Maneiro, E.; Pérez-Conde, C.; Moreno-Bondi, M.C.; Costas, E. (2009) *Biosens. Bioelectron.* 24, 3538 – 3543.
- [504] Das, N.; Reardon, K.F. (2012) *Anal. Letters* 45, 251 – 261.
- [505] Moreira, F.T.C.; Freitas, V.A.P.; Sales, M.G.F. (2011) *Microchim Acta* 172, 15 – 23.
- [506] Gholivand, M.B.; karimian, N.; Malekzadeh, G. (2012) *Talanta* 89, 513 – 520.
- [507] Pardieu, E.; Cheap, H.; Vedrine, C.; Lazerges, M.; Lattach, Y.; Garnier, F.; Remita, S.; Pernelle, C. (2009) *Anal. Chim. Acta* 649, 236 – 245.
- [508] Belmont, A.S.; Jaeger, S.; Knopp, D.; Niessner, R.; Gauglitz, G.; Haupt, K. (2007) *Biosens. Bioelectron.* 22, 3267 – 3272.
- [509] Liu, R.; Guan, G.; Wang, S.; Zhang, Z. (2011) *Analyst* 136, 184 – 190.
- [510] Zhang, C.J.; Luo, S.Q. (2011) *Microchim. Acta* 175, 63 – 68.
- [511] Rotiroia, L.; De Stefano, L.; Rendina, I.; Moretti, L.; Rossi, A.M.; Piccolo, A. (2005) *Biosens. Bioelectron.* 20, 2136 – 2139.
- [512] He, Y.; Wang, H.F.; Yan, X.P. (2008) *Anal. Chem.* 80, 3832 – 3837.
- [513] Raz, S.R.; Bremer, M.G.E.G.; Haasnoot, W.; Norde, W. (2009) *Anal. Chem.* 81, 7743 – 7749.
- [514] Fernández, F.; Hegnerová, K.; Piliarik, M.; Baeza, F.S.; Homola, J.; Marco, M.P. (2010) *Biosens. Bioelectron.* 26, 1231 – 1238.
- [515] Pellegrini, G.E.; Carpico, G.; Coni, E. (2004) *Anal. Chim. Acta* 520, 13 – 18.



- [516] Podola, B.; Melkonian, M. (2005) *J. Appl. Phycol.* 17, 261 – 271.
- [517] Bhand, S.; Surugiu, I.; Dzgoev, A.; Ramanathan, K.; Sundaram, P.V.; Danielsson, B. (2005) *Talanta* 65, 331 – 336.
- [518] Dostálek, J.; Přibyl, J.; Homola, J.; Skládal, P. (2007) *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1841 – 1847.
- [519] Hu, C.; Gan, N.; Chen, Y.; Bi, L.; Zhang, X.; Song, L. (2009) *Talanta* 80, 407 – 410.
- [520] Lindner, P.; Molz, R.; Yacoub-George, E.; Wolf, H. (2009) *Anal. Chim. Acta* 636, 218 – 223.
- [521] Zhu, Y.; Xu, L.; Ma, W.; Chen, W.; Yan, W.; Kuang, H.; Wang, L.; Xu, C. (2011) *Biosens. Bioelectron.* 26, 4393 – 4398.
- [522] Han, J.; Zhang, J.; Xia, Y.; Jiang, L. (2011) *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 391, 184 – 189.
- [523] Ding, Y.; Mutharasan, R. (2011) *Environ. Sci. Technol.* 45, 1490 – 1496.
- [524] Lotierzo, M.; Abuknesha, R.; Davis, F.; Tothill, I.E. (2012) *Environ. Sci. Technol.* 46, 5504 – 5510.
- [525] Loyprasert, S.; Thavarungkul, P.; Asawatreratanakul, P.; Wongkittisuksa, B.; Limsakul, C.; Kanatharana, P. (2008) *Biosens. Bioelectron.* 24, 78 – 86.
- [526] Yu, H.W.; Lee, J.; Kim, S.; Nguyen, G.H.; Kim, I.S. (2009) *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 2173 – 2181.
- [527] Campàs, M.; Marty, J.L. (2007) *Biosens. Bioelectron.* 22, 1034 – 1040.
- [528] Ma, W.; Chen, W.; Qiao, R.; Liu, C.; Yang, C.; Li, Z.; Xu, D.; Peng, C.; Jin, Z.; Xu, S.; Wang, L. (2009) *Biosens. Bioelectron.* 25, 240 – 243.
- [529] Huet, A.C.; Charlier, C.; Singh, G.; Godefroy, S.B.; Leivo, J.; Vehniäinen, M.; Nielsen, M.W.F.; Weigel, S.; Delahaut, Ph. (2008) *Anal. Chim. Acta* 623, 195 – 203.
- [530] Weigel, S.; Pikkemaat, M.G.; Elferink, J.W.A.; Mulder, P.P.J.; Huet, A.C.; Delahaut, P.; Schittko, S.; Flerus, R.; Nielsen, M. (2009) *Food Addit. Contam.* 26, 441 – 452.
- [531] Huet, A.C.; Charlier, C.; Weigel, S.; Godefroy, S.B.; Delahaut, P. (2009) *Food Addit. Contam.* 26, 1341 – 1347.
- [532] Ionescu, R.E.; Jaffrezic-Renault, N.; Bouffier, L.; Gondran, C.; Cosnier, S.; Pinacho, D.G.; Marco, M.P.; Sánchez-Baeza, F.J.; Healy, T.; Martelet, C. (2007) *Biosens. Bioelectron.* 23, 549 – 555.

- [533] Attia, M.S.; Youssef, A.O.; Essawy, A.A.; Abdel-Mottaleb, M.S.A. (2012) *J. Lumin.* 132, 2741 – 2746.
- [534] Garifallou, G.Z.; Tsekenis, G.; Davis, F.; Higson, S.P.J.; Millner, P.A.; Pinacho, D.G.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M.P.; Gibson, T.D. (2007) *Anal. Lett.* 40, 1412 – 1422.
- [535] Wu, C.C.; Lin, C.H.; Wang, W.S. (2009) *Talanta* 79, 62 – 67.
- [536] Reder, S.; Dieterle, F.; Jansen, H.; Alcock, S.; Gauglitz, G. (2003) *Biosens. Bioelectron.* 19, 447 – 455.
- [537] Salmain, M.; Fischer-Durand, N.; Pradier, C.M. (2008) *Anal. Biochem.* 373, 61 – 70.
- [538] Pichetsurnthorn, P.; Vattipalli, K.; Prasad, S. (2012) *Biosens. Bioelectron.* 32, 155 – 162.
- [539] Tran, H.V.; Yougnia, R.; Reisberg, S.; Piro, B.; Serradji, N.; Nguyen, T.D.; Tran, L.D.; Dong, C.Z.; Pham, M.C. (2012) *Biosens. Bioelectron.* 31, 62 – 68.
- [540] Valera, E.; Ramón-Azcón, J.; Barranco, A.; Alfaro, B.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M.P.; Rodríguez, A. (2010) *Food Chem.* 122, 888 – 894.
- [541] Ramón-Azcón, J.; Valera, E.; Rodríguez, A.; Barranco, A.; Alfaro, B.; Sanchez-Baeza, B.; Marco, M.P. (2008) *Biosens. Bioelectron.* 23, 1367 – 1373.
- [542] Zacco, E.; Galve, R.; Marco, M.P.; Alegret, S.; Pividori, M.I. (2007) *Biosens. Bioelectron.* 22, 1707 – 1715.
- [543] Farré, M.; Martínez, E.; Ramón, J.; Navarro, A.; Radjenovic, J.; Mauriz, E.; Lechuga, L.; Marco, M.P.; Barceló, D. (2007) *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 207 – 214.
- [544] Jornet, D.; González-Martínez, M.A.; Maquieira, A.; Puchades, R. (2007) *Anal. Chem.* 79, 9331 – 9339.
- [545] Ionescu, R.E.; Gondran, C.; Bouffier, L.; Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C.; Cosnier, S. (2010) *Electrochim. Acta* 55, 6228 – 6232.
- [546] Suri, C.R.; Kaur, J.; Gandhi, S.; Shekhawat, G.S. (2008) *Nanotechnology* 19, 235502 – 235508.
- [547] Cela, R.; Lorenzo, R.A.; Casais, M.C. (2002) Extracción y lixiviación por disolventes en: *Técnicas de separación en química analítica*. Ed. Síntesis, Madrid.
- [548] Su, S.; Chang, M.; Lang, Ch.; Chou, S. (2003) *J. Food Drug Anal.* 11, 114 – 127.
- [549] Maxwell, R.J.; Cohen, E.; Donoghue, D.J. (1999) *J. Agric. Food Chem.* 47, 1563 – 1567.
- [550] Hawthorne, S.B.; Yang, Y.; Miller, D.J. (1994) *Anal. Chem.* 66, 2912 – 2920.

- [551] Decisión 2002/657/CE de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 221 de 17 de agosto de 2002.
- [552] Marco, P.M.; Gee, S.; Hammock, B.D. (1995) *Trends Anal. Chem.* 14, 415 – 425.
- [553] Ballesteros, B.; Barcelo, D.; Sanchez-Baeza, F.; Camps, F.; Marco, M.P. (1998) *Anal.Chem.* 70, 4004 – 4014.
- [554] Galve, R.; Sanchez-Baeza, F.; Camps, F.; Marco, M.P. (2002) *Anal. Chim. Acta* 452, 191 – 206.
- [555] Oubina, A.; Ballesteros, B.; Carrasco, P.B.; Galve, R.; Gascón, J.; Iglesias, F.; Sanvicens, N.; Marco, M.P. (2000) Immunoassays for environmental analysis, en: *Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants. Techniques, Applications and Quality Assurance*. Barcelo, D.; Ed. Elsevier B.V., Amsterdam.
- [556] Liu, Y.H.; Jin, M.J.; Gui, W.J.; Cheng, J.L.; Guo, Y.R.; Zhu, G.N. (2007) *Anal. Chim. Acta* 591, 173 – 182.
- [557] Tijssen, P. (1985) Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, en: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Burdon, R.H.; Van Knippenberg, P.H.; Ed. Elsevier B.V., Amsterdam.
- [558] Li, Q.X.; Zhao, M.S.; Gee, S.J.; Kurth, M.J.; Seiber, J.N.; Hammock, B.D. (1991) *J. Agric. Food Chem.* 39, 1685 – 1692.
- [559] Perez-Amodio, S.; Holownia, P.; Davey, C.L.; Price C.P. (2001) *Anal. Chem.* 73, 3417 – 3425.
- [560] Vanoss, C.J. (1995) *Mol. Immunol.* 32, 199 – 211.
- [561] Ballesteros, B.; Barceló, D.; Camps, F.; Marco, M.P. (1997) *Anal. Chim. Acta* 347, 139 – 147.
- [562] Weller, M.G.; Weil, L.; Niessner, R. (1992) *Mikrochim. Acta* 108, 29 – 40.
- [563] Parker, G.A. (1991) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74, 868 – 871.
- [564] Horwitz, W.; Kamps, L.R.; Boyer, K.W. (1980) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63, 1344 – 1354.
- [565] Wortberg, M.; Goodrow, M.H.; Gee, S.J.; Hammock, B.D. (1996) *J Agric Food Chem* 44, 2210 – 2219.
- [566] Fischer-Durand, N.; Vessieres, A.; Heldt, J.M.; le Bideau, F.; Jaouen, G. (2003) *J. Organomet. Chem.* 668, 59 – 66.
- [567] Schobel, U.; Coille, I.; Brecht, A.; Steinwand, M.; Gauglitz, G. (2001) *Anal. Chem.* 73, 5172 – 5179.

- [568] Breault-Turcot, J.; Masson, J.F. (2012) *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1477 – 1484.
- [569] Smith, E.A.; Chen, W. (2008) *Langmuir* 24, 12405 – 12409.
- [570] Hsieh, H.Y.; Wang, P.C.; Wu, C.W.; Chieng, C.C.; Tseng, F.G. (2009) *Anal. Chem.* 81, 7908 – 7916.
- [571] Miller, J.C.; Zhou, H.; Kwekel, J.; Cavallo, R.; Burke, J.; Butler, E.B.; Teh B.S.; Haab, B.B. (2003) *Proteomics* 3, 56 – 63.
- [572] Ramakrishnan, R.; Dorris, D.; Lublinsky, A.; Nguyen, A.; Domanus, M.; Prokhorova, A.; Gieser, L.; Touma, E.; Lockner, R.; Tata, M.; Zhu, X.; Patterson, M.; Shippy, R.; Sendera T.; J. Mazumder, A. (2002) *Nucleic Acid Res.* 30, e30 – e42.
- [573] Afabassiev, V.; Hanemann, V.; Wölfl, S. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, e66 – e70.
- [574] Koch, C.A.; Li, P.C.H.; Utkhede, R.S. (2005) *Anal. Biochem.* 342, 93 – 102.
- [575] Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; Fernández-Lafuente, R.; Huguet, J.; Guisán, J.M. (1998) *Biotechnol. Bioeng.* 58, 486 – 493.
- [576] Carrasco-López, C.; Godoy, C.; de las Rivas, B.; Fernández-Lorente, G.; Palomo, J.M.; Guisán, J.M.; Fernández-Lafuente, R.; Martínez-Ripoll, M.; Hermoso, J.A. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 4365 – 4372.
- [577] Dumitrascu, M.; Meltzer, V.; Sima, E.; Virgolici, M.; Albu, M.G.; Fica, A.; Moise, V.; Minea, R.; Vancea, C.; Scarisoreanu, A.; Scarlat, F. (2011) *Dig. J. Nanomater. Bios.* 6, 1793 – 1803.
- [578] Ombelli, M.; Eckmann, D.M.; Composto, R. (2003) *J. MRS Proceedings* 774, O7.25.
- [579] Maia, J.; Ferreira, L.; Carvalho, R.; Ramos, M.A.; Gil, M.H. (2005) *Polymer* 46, 9604 – 9614.
- [580] Tan, H.; Hu, X. (2012) *J. Appl. Polym. Sci.* 126, E180 – E187.
- [581] Tuma, R. (2005) *J. Raman Spectrosc.* 36, 307 – 319.
- [582] Fischer, W.B.; Eysel, H.H. (1992) *Spectrochim. Acta A* 48, 725 – 732.
- [583] Socrates, G. (2001) *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. 3<sup>a</sup> Ed.; Ed. Wiley & Sons, Chichester.
- [584] Kosaka, P.M.; Kawano, O.A.; El Seoud, O.A.; Petri, D.F.S. (2007) *Langmuir* 23, 12167 – 12173.
- [585] Carrasco-López, C.; Godoy, C.; De las Rivas, B.; Fernández-Lorente, G.; Palomo, J.M.; Guisan, J.M.; Fernández-Lafuente, R.; Martínez-Ripoll, M.; Hermoso, J.A. (2008) *Acta Cryst. F* 64, 1043 – 1045.

- [586] Rúa, M.L.; Schmidt-Dannert, C.; Wahl, S.; Sprauer, A.; Schmid, R.D. (1997) *J. Biotechnol.* 56, 89 – 102.
- [587] Sips, R. (1948) *J. Chem. Phys.* 16, 490 – 495.
- [588] Tsarfati-BarAd, I.; Sauer, U.; Preininger, C.; Gheber, L.A. (2011) *Biosens. Bioelectron.* 26, 3774 – 3781.
- [589] Seidel, M.; Niessner, R. (2008) *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1521–1544.
- [590] Marciello, M.; Mateo, C.; Guisán, J.M. (2011) *Colloids Surf. B* 84, 556 – 560.
- [591] Boehm, H.P. (2002) *Carbon* 40, 145 – 149.
- [592] Lennon, D.; Lundie, D.T.; Jackson, S.D.; Kelly, J.P.; Parker, S.F. (2002) *Langmuir* 18, 4667 – 4673.
- [593] Stankovich, S.; Dikin, D.A.; Piner, R.D.; Kohlhaas, K.A.; Kleinhammes, A.; Jia, Y.; Wu, Y.; Nguyen, S.T.; Ruoff, R.S. (2007) *Carbon* 45, 1558 – 1565.
- [594] Hamon, M.A.; Hu, H.; Bhowmik, P.; Niyogi, S.; Zhao, B.; Itkis, M.E.; Haddon, R.C. (2001) *Chem. Phys. Lett.* 347, 8 – 12.
- [595] Del Canto, E.; Flavin, K.; Movia, D.; Navio, C.; Bittencourt, C.; Giordani, S. (2011) *Chem. Mater.* 23, 67 – 74.
- [596] Holzinger, M.; Abraham, J.; Whelan, P.; Graupner, R.; Ley, L.; Henrich, F.; Kappes, M.; Hirsch, A. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8566 – 8580.
- [597] Ramdutt, D.; Charles, C.; Hudspeth, J.; Ladewig, B.; Gengenbach, T.; Boswell, R.; Dicks, A.; Brault, P. (2007) *J. Power Sources* 165, 41 – 48.
- [598] Bittolo, S.; Valentini, L.; Verdejo, R.; Fierro, J.L.G.; Peponi, L.; Lopez-Manchado, M.A.; Kenny, J.M. (2009) *Chem. Mater.* 21, 3433 – 3438.
- [599] Du, J.; Wang, D.; Wilkie, C.A.; Wang, J. (2003) *Polym. Degrad. Stab.* 79, 319 – 324.
- [600] Schneider, P.; Hammock, B.D. (1992) *J. Agric. Food Chem.* 40, 525 – 530.
- [601] Liab, Y.; Jiab, B.; Chenab, W.; Liua, L.; Xua, C.; Penga, C.; Wang, L. (2008) *Food Agric. Immunol.* 19, 251 – 264.

## ABREVIATURAS

---



2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
Ab	Anticuerpo
AcN	Acetonitrilo
ADDA	3-Amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-ácido dienoico
AFM	Microscopía de fuerza atómica
Ag	Antígeno
Ag*	Antígeno marcado
ATR	Atrazina
BC	Tampón bicarbonato
BL	N-Biotinil-3,6,9-trioxaundecil-1,11-diamina
BSA	Albúmina de suero bovino
BTL2	Lipasa de <i>Geobacillus thermocatenulatus</i>
C64A1	Anticuerpo monoclonal selectivo a microcistinas (HyTest Ltd)
C64C12	Anticuerpo monoclonal selectivo a microcistinas (HyTest Ltd)
CE	Electroforesis capilar
CIPRO	Ciprofloxacino
CPGA	Inmunoadsorbente Prosep®-A Media
CR	Reactividad cruzada
DAD	Detector de hilera de diodos
DEA	Desetil-atrazina
DIA	Desisopropil-atrazina
DLLME	Microextracción dispersiva liquido-liquido
DMDMS	Dimetildimetoxisilano
dm-MCRR	Microcistina RR desmetilada
DMSO	Dimetilsulfoxido
DR	Intervalo dinámico, o de trabajo
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA	Etilendiamino-tetracetato tetrasódico
EIA	Inmunoensayo enzimático
ELISA	Inmunoensayo enzimático en fase heterogénea
ENRO	Enrofloxacino
EPA	Agencia de Protección Ambiental
ESI	Ionización por electrospray
ET	Trazador enzimático



FLD	Detector de fluorescencia
FOTS	1H,1H,2H,2H-perfluorooctiltriclorosilano
FQ8G13A	Anticuerpo monoclonal selectivo a FQs
FQ8G19A	Anticuerpo monoclonal selectivo a FQs
FQs	Fluoroquinolonas
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GA	Glutaraldehído
GC	Cromatografía de gases
Gly	Glicina
HF-LPME	Microextracción líquida en fibra hueca
HMDS	1,1,1,3,3,3-Hexametildisilazano
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPPA	3- <i>p</i> -Hidroxifenilpropionico
HPR	Peroxidasa de rábano picante
Igs	Inmunoglobulinas
KLH	Hemocianina de lapa californiana
LC	Cromatografía de líquidos
LLE	Extracción líquido-líquido
LMR	Límite máximo de residuo
LOD	Límite de detección
LOME	Lomefloxacino
LPME	Microextracción líquida
MAB17401	Anticuerpo monoclonal selectivo a FQs (QED Bioscience Inc.)
MAB	Anticuerpo monoclonal
MAE	Extracción asistida por microondas
MC10E7	Anticuerpo monoclonal selectivo a microcistinas (Alexis Biochemicals)
MCs	Microcistinas
MeOH	Metanol
MES	Ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico
MIPs	Polímeros de impronta molecular
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida
MW	Peso molecular

n	Índice de refracción
NHS	N-hidroxisuccinimida
NOR	Norfloxacino
NPD	Detector de nitrógeno-fósforo
OS	Soporte comercial de octil-agarosa
OVA	Ovoalbúmina
PAb	Anticuerpo policlonal
PAG	Inmunoadsorbente Ultralink® Immobilized AG Plus
PB	Tampón fosfato
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	Tampón fosfato salino con Tween 20
PBSTM	Tampón fosfato salino con Tween 20 y leche desnatada en polvo
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PLE	Extracción con líquidos presurizados
PMMA	Poli(metil metacrilato)
PNA <sub>s</sub>	Ácidos nucleicos peptídicos
PP	Fosfatasas
PP1	Fosfatasas de tipo 1
PP2A	Fosfatasas de tipo 2A
PS-DVB	Poliestireno-divinilbenceno
Q <sub>s</sub>	Quinolonas
QuEChERS	<i>Quick, cheap, effective, rugged and safe</i>
RAbs	Anticuerpos recombinantes
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa
SAM	Monocapas autoensambladas
SARA	Sarafloxacino
SBSE	Extracción por adsorción en barra agitadora
SBSE-LD	Extracción por adsorción en barra agitadora y desorción líquida
SBSE-TD	Extracción por adsorción en barra agitadora y desorción térmica
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SIM	Simazina
SLE	Extracción sólido-líquido
SPE	Extracción en fase sólida

SPME	Microextracción en fase sólida
SPR	Resonancia de plasmón superficial
s-TRZs	Triazinas simétricas
TDI	Ingesta diaria admisible
TFC	Cromatografía de flujo turbulento
TIR	Reflexión interna total
TIRF	Reflexión interna total de fluorescencia
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
Triamino-APMS	3-(Trimetoxisililpropil)dietilenetriamina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TRZ	Trizina
UAE	Extracción asistida por radiación de ultrasonidos
UA-MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida combinada con ultrasonidos
UV	Ultravioneta
WHO	Organización Mundial de la Salud
XPS	Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X